

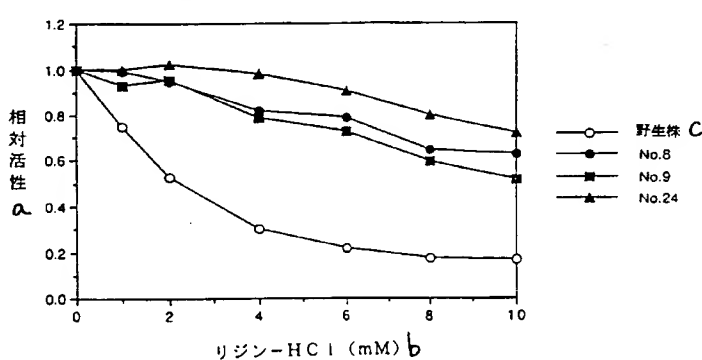
PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/00, 9/88, 9/12</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO96/41871</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>1996年12月27日 (27.12.96)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP96/00648 <b>(22) 国際出願日</b> 1996年3月14日 (14.03.96)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平7/146054      1995年6月13日 (13.06.95)      JP  <b>(71) 出願人</b> (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人</b> (米国についてのみ) 児島宏之(KOJIMA, Hiroyuki)[JP/JP] 尾川由理(OGAWA, Yuri)[JP/JP] 川村和枝(KAWAMURA, Kazuo)[JP/JP] 佐野孝之輔(SANO, Konosuke)[JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> CN, HU, JP, MX, SK, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING L-LYSINE BY FERMENTATION</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 発酵法によるL-リジンの製造法   <p>a ... Relative activity b ... Lysine-HCl c ... wild strain</p> <b>(57) Abstract</b> <p>A process for producing L-lysine which comprises culturing in an appropriate medium a bacterium belonging to the genus <i>Serratia</i>, which has been transformed by introducing a DNA encoding a dihydrodipicolinic acid synthetase originating in a bacterium belonging to the genus <i>Escherichia</i> or <i>Serratia</i> having a mutation of releasing the feedback inhibition by L-lysine and another DNA encoding an aspartokinase originating in a bacterium belonging to the genus <i>Escherichia</i> or <i>Serratia</i> having a mutation of releasing the feedback inhibition by L-lysine into the cells, and harvesting the L-lysine thus accumulated in the culture.</p>		

(57) 要約

Ｌ－リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌又はセラチア属細菌由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、Ｌ－リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌又はセラチア属細菌由来のアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されることによって形質転換されたセラチア属細菌を、好適な培地中で培養し、該培養物中にＬ－リジンを生産蓄積させ、該培養物からＬ－リジンを採取する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AU	オーストラリア	EE	エストニア	LR	レソト	RO	ルーマニア
AZ	アゼルバイジャン	ES	スペイン	LT	リトアニア	RU	ロシア連邦
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BB	ババルバドス	GB	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GU	ギニア	MD	モルドバ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	HN	ハンガリー	MG	マダガスカル	SZ	ス威士ランド
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IT	イタリア	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CC	中央アフリカ共和国	JP	日本	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	KE	ケニア	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CH	スイス	KR	韓国	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KZ	カザフスタン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国			NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ			NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国			NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム

## 明細書

## 発酵法によるL-リジンの製造法

## 技術分野

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法によるL-リジンの製造法、この製造法に用いるDNA及び微生物に関するものである。

## 背景技術

従来、発酵法によりL-リジンを製造する場合、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。L-リジンを生産する人工変異株は数多く知られており、その多くはS-2-アミノエチルシステイン(AEC)耐性変異株であり、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属、またはセラチア属に属している。また、組換えDNAを使用した形質転換体を用いる(米国特許第4278765号)等、アミノ酸の生産を増加させる種々の技術が開示されている。

例えばセラチア属細菌は、「応用分子遺伝学」(講談社サイエンティフィック1986年、ISBN4-06-139659-5)や「アミノ酸発酵」(学会出版センター1986年、ISBN4-7622-9454-3)に示されるように、L-プロリン、L-ヒスチジン、L-アルギニン、L-スレオニン、L-バリン、L-イソロイシン等の各種アミノ酸の生産菌として広く用いられ、種々の面でアミノ酸生産菌として優れた性質を有している。セラチア属細菌を用いた多種のアミノ酸生産が報告されているが、L-リジンを生産するようになった報告(特公昭51-9393号公報)によると、収率(生成したL-リジン塩酸塩の濃度を初発の炭素源濃度で割った値)は5.4%と計算される。

セラチア属細菌の代表的菌株であるセラチア・マルセッセンス(*Serratia marcescens*)はエシェリヒア属細菌と遺伝子構造、遺伝子発現調節機構が類似しており、さらにエシェリヒア属細菌で組換えDNAに用いられるクローニングベクタ

ーがセラチア属細菌にも用いる事ができる（特開平2-27980号公報、特開平5-10076号広報）。

ところで、ジヒドロジピコリン酸合成酵素（DDPS）は、アスパルトセミアルデヒドとピルビン酸を脱水縮合させ、ジヒドロジピコリン酸を合成する酵素であり、この反応はアスパラギン酸系アミノ酸の生合成において、L-リジン生合成系への分岐の入口となっている。エシェリヒア属細菌においてはアスパルトキナーゼとともにL-リジン生合成の重要な調節部位を担っている事が知られている。エシェリヒア属細菌のDDPSは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られている。

DDPSはエシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*（*E. coli*）：大腸菌）ではdapAという遺伝子にコードされている。このdapAはすでにクローニングされており、塩基配列も決定されている（Richaud, F. et al. J. Bacteriol., 297（1986））。

一方、アスパルトキナーゼ（以下、「AK」と略すことがある）は、アスパラギン酸をβ-ホスホアスパラギン酸に変える反応を触媒する酵素であり、アスパラギン酸系のアミノ酸の生合成系の主な調節酵素となっている。*E. coli*のAKは3種あり（AKI, AKII, AKIII）、うち2つはホモセリンデヒドロゲナーゼ（以下、「HD」と略すことがある）との複合酵素である。複合酵素の内のひとつはthrA遺伝子にコードされるAKI-HDIであり、もう一方はmetLM遺伝子にコードされるAKII-HDIIである。AKIはスレオニンとイソロイシンによる協奏的抑制及びスレオニンによる阻害を受け、AKIIはメチオニンによる抑制を受ける。

これらに対し、AKIIIのみは単機能酵素であり、lysCと名付けられた遺伝子の産物であって、L-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。菌体内でのこれらの活性の割合は、AKI:AKII:AKIII=約5:1:4となっている。

上述したように、DDPS及びAKIIIはL-リジンによるフィードバック阻害を受けるため、L-リジンを効率よく生産させるための障害となっている。したがって、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないDDPSあるいはAKIIIの変異酵素及びそれらの遺伝子を取得することができれば、セラチア属細菌を

用いて効率の良いL-リジンの発酵生産を行うことができることが期待されるが、DDPSの変異酵素を示した先行文献はなく、また、AKIIIの変異酵素についても報告はあるものの(Boy, E. et al., J. Bacteriol., 112, 84 (1972))、同変異酵素がL-リジンの生産性を改善できることを示唆した例は知られていない。さらに、セラチア属細菌のL-リジン生合成系遺伝子についても知られていない。

#### 発明の開示

本発明は、上記観点からなされたものであり、L-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたDDPSとAK、特にエシェリヒア属細菌由来のDDPSとAKIIIを取得し、セラチア属細菌を用いて従来よりも効率よくL-リジンを製造する方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、L-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたエシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードするDNAを取得することに成功した。尚、L-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたE. coli由来のDDPSをコードするDNAを本明細書において変異型dapAあるいはdapA\*とよぶことがある。

本願発明者らはまた、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼおよびL-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたDDPSを保持するセラチア属細菌を創製した。尚、L-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたE. coli由来のアスパルトキナーゼをコードするDNAを本明細書において変異型lysCあるいはlysC\*とよぶことがある。

さらに本願発明者らは、変異型dapA及び変異型lysCを保持するセラチア属細菌を創製した。そして同セラチア属細菌を好適な培地で培養することにより、該培養物中にL-リジンを著量生産蓄積させ得ることを見出した。

すなわち本願発明は、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAが細胞内に導入されて形質転換されたセラチア属細菌である。ジヒドロジピコリン酸合成酵素としては、エシェリヒア属細菌由来の酵素が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素において、L-リジンによるフィードバック阻害が

解除される変異としては、配列表の配列番号4に記載されるジヒドロジピコリン酸合成酵素のアミノ酸配列中、N-末端から81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させる変異、118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異、81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させかつ118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異が挙げられる。また、ジヒドロジピコリン酸合成酵素は、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有していれば、セラチア属細菌固有のものでもよい。

本願発明はさらに、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをさらに保持することを特徴とする前記セラチア属細菌である。L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをセラチア属細菌に保持させる方法としては、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌由来のアスパルトキナーゼIIIをコードするDNAをセラチア属細菌細胞内に導入する方法が挙げられる。

L-リジンによるフィードバック阻害が解除されるエシェリヒア属細菌由来のアスパルトキナーゼIIIの変異としては、配列表の配列番号8に記載されるアスパルトキナーゼIIIのアミノ酸配列中、N-末端から323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させかつ408番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、34番目のアルギニン残基をシステイン残基に置換させかつ323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、325番目のロイシン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、318番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、318番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ349番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、345番目のセリン残基をロイシン残基に置換させる変異、347番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、352番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、352番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ369番目のセリン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、164番目のグルタミン酸残基をリジン残基に置換させる変異、417番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ419番目のシステ

イン残基をチロシン残基に置換させる変異が挙げられる。

もちろん、Ｌーリジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼは、セラチア属細菌固有のものであってもよい。

尚、Ｌーリジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNA及びＬーリジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するアスパルトキナーゼをコードするDNAは、各々セラチア属細菌の細胞内で同一または別々のプラスミド上に保持されていてもよい。

また、Ｌーリジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAが導入されるセラチア属細菌としては、リジンデカルボキシラーゼを欠損するセラチア属細菌が挙げられる。

本発明はまた、上記のセラチア属細菌のいずれかを好適な培地で培養し、該培養物中にＬーリジンを生産蓄積せしめ、該培養物からＬーリジンを採取することを特徴とするＬーリジンの製造法を提供する。

尚、本明細書において、DDPS又はAKIIIをコードするDNA、あるいはこれらにプロモーターを含むDNAを、「DDPS遺伝子」又は「AKIII遺伝子」ということがある。また、Ｌーリジンによるフィードバック阻害が解除された変異酵素を単に「変異型酵素」、これをコードするDNAあるいはこれにプロモーターを含むDNAを「変異型遺伝子」ということがある。さらに、「Ｌーリジンによるフィードバック阻害が解除される」とは、実質的に阻害が解除されていればよいことを意味し、完全に解除されている必要はない。

以下、本発明について詳細に説明する。

< 1 > 本発明の方法に用いる変異型ジヒドロジピコリン酸合成酵素 (DDPS) をコードするDNA

本発明の方法に用いる変異型DDPSをコードするDNAは、野生型DDPSをコードするDNAにおいて、コードされるDDPSのＬーリジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するものである。DDPSとしては、エシェリヒア属細菌由来のもの、特にE. coli由来のDDPSが挙げられる。また、セラ

チア属細菌自体のDDPSであっても、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するものであれば、用いることができる。

エシェリヒア属細菌由来のDDPSのL-リジンによるフィードバック阻害を解除する変異としては、配列表の配列番号4に記載されるDDPSのアミノ酸配列中、DDPSのN-末端から

- ①81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させる変異、
  - ②118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異、
  - ③81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させかつ118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異、
- が挙げられる。

野生型DDPSをコードするDNAとしては、エシェリヒア属細菌またはセラチア属細菌由来のDDPSをコードするものであれば特に制限されない。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードするDNAとして、具体的には配列番号4に示すアミノ酸配列をコードするDNAが挙げられ、さらに具体的には配列番号3に示す塩基配列のうち、塩基番号272～1147で表される配列が挙げられる。これらの配列において、上記アミノ酸残基の置換を起こすような塩基配列の変異を有するものが、本発明に用いる変異型DDPSをコードするDNAの例である。尚、置換されたアミノ酸残基に対応するコドンは、そのアミノ酸残基をコードするものであれば種類は特に問わない。また、菌種や菌株の違いにより保持するDDPSの配列がわずかに相異することが予想されるが、このような酵素の活性に関与しない位置でのアミノ酸残基の置換、欠失あるいは挿入を有するものも本発明に用いる変異型DDPS遺伝子に含まれる。

このような変異型遺伝子を取得する方法は以下の通りである。まず、野生型DDPS遺伝子又はDDPSの酵素活性に実質的に影響を与えない変異を有するDDPS遺伝子を含有するDNAをインビトロ変異処理し、変異処理後のDNAと宿主に適合するベクターDNAとを連結して組換えDNAを得る。組換えDNAを宿主微生物に導入して形質転換体を得、同形質転換体のうちで変異型DDPSを発現するに至ったものを選択すれば、同形質転換体が変異型遺伝子を保持している。また、野生型DDPS遺伝子又は他の変異を有するDDPS遺伝子を



含有するDNAを、宿主に適合するベクターDNAと連結して組換えDNAを得て、その後組換えDNAをインビトロ変異処理し、変異処理後の組換えDNAを宿主微生物に導入して形質転換体を得、同形質転換体のうちで変異型DDPSを発現するように至ったものを選択しても、同形質転換体は変異型遺伝子を保持している。

野生型酵素を生産する微生物を変異処理し、変異型酵素を生産する変異株を創成した後、該変異株から変異型遺伝子を取得してもよい。もしくは、野生型遺伝子が連結されている組換えDNAが導入されている形質転換体を変異処理し、変異型酵素を生産する変異株を創成した後、該変異株から組換えDNAを回収すれば、同DNA上に変異型遺伝子が創成される。

DNAをインビトロ変異処理するための薬剤としては、ヒドロキシルアミン等が挙げられる。ヒドロキシルアミンは、シトシンをN<sup>4</sup>-ヒドロキシシトシンに変えることによりシトシンからチミンへの変異を起こす化学変異処理剤である。また、微生物自体を変異処理する場合は、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤による処理を行う。

上記野生型DDPS遺伝子あるいは他の変異を有するDDPS遺伝子を含有するDNAの供与菌としては、エシェリヒア属又はセラチア属に属する微生物をはじめとしていかなるものを用いてもかまわない。エシェリヒア属に属する微生物として具体的にはナイトハルトらの著書 (Neidhardt, F. C. et. al., *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D. C., 1208, table 1) にあげられるものが利用できる。たとえば、*E. coli* JM109 株や、MC1061 株などがあげられる。DDPS遺伝子を含有するDNAの供与菌として野生株を用いた場合、野生型のDDPS遺伝子を含むDNAが取得できる。

一方、セラチア属に属する微生物としては、セラチア・マルセッセンス、例えばセラチア・マルセッセンス AJ13125株 (FERM BP-5441) 等が挙げられる。

#### (1) 野生型DDPS遺伝子の取得

以下に、DDPS遺伝子を含有するDNAの調製例について述べる。ここでは主と

して*E. coli*について具体的に説明するが、他のエシェリヒア属細菌及びセラチア属細菌についても同様にしてDDPS遺伝子を取得することができる。

まず、野生型のdapAをもつ*E. coli*例えばMC1061株を培養して培養物を得る。上記微生物を培養するには、通常の固体培養法で培養しても良いが、集菌の際の効率を考慮すると液体培養法を採用して培養するのが好ましい。また、培地としては、例えば酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカーまたは大豆もしくは小麦の浸出液等の1種類以上の窒素源に、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄または硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要に応じて糖質原料、ビタミン等を適宜添加した物が用いられる。なお、培地の初発pHは、6～8に調製するのが適当である。また培養は30～42℃、好ましくは37℃前後で4～24時間、通気攪拌深部培養、振盪培養または静置培養等により行う。

このようにして得られた培養物を、例えば3,000 r.p.m.で5分間遠心分離して*E. coli* MC1061株の菌体を得る。この菌体より、例えば斎藤、三浦の方法(Biochem. Biophys. Acta., 72, 619, (1963))、K. S. Kirbyの方法(Biochem. J., 64, 405, (1956))等の方法により染色体DNAを得ることができる。

こうして得られた染色体DNAからDDPS遺伝子を単離するために、染色体DNAライブラリーを作製する。まず、染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々の断片混合物を得る。切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、Sau3AIを、温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1～10ユニット/mlで様々な時間(1分～2時間)染色体DNAに作用させてこれを消化する。

ついで、切断された染色体DNA断片を、エシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素Sau3AIと相補的な末端塩基配列を生じさせる制限酵素、例えばBamHIを、温度30℃以上、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは1～3時間、ベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。次いで、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物

と切断開裂されたベクターDNAを混合し、これにDNAリガーゼ、好ましくはT4 DNAリガーゼを、温度4～16℃、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは6～24時間作用させて組換えDNAを得る。

得られた組換えDNAを用いて、エシェリヒア属の微生物、例えば大腸菌K-12株、好ましくはJE7627株(ponB704, dacB12, pfv<sup>+</sup>, tonA2, dapA, lysA, str, malA38, metB1, ilvH611, leuA371, proA3, lac-3, tsx-76)のようなDDPS欠損変異株を形質転換して染色体DNAライブラリーを作製する。この形質転換は、D. M. Morris onの方法(Methods in Enzymology 68, 326 (1979))あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))等により行うことができる。なお、JE7627株は国立遺伝学研究所(日本国静岡県三島市)より入手可能である。

得られた染色体DNAライブラリーの中から、DDPS活性が増大した株あるいはDDPS遺伝子欠損に起因する栄養要求性が相補された株よりDDPS遺伝子の組換えDNAをもつ菌株を得る。例えば、DDPS欠損変異株はジアミノピメリン酸要求性であるので、DDPS欠損変異株を宿主に用いた場合は、ジアミノピメリン酸を含有しない培地上で生育可能となった菌株を単離し、該菌株から組換えDNAを回収することにより、DDPS遺伝子を含有するDNA断片を得ることができる。

DDPS遺伝子を含有する組換えDNAをもつ候補株が、実際にDDPS遺伝子がクローニングされた組換えDNAを保持するかどうかを確認するには、候補株から細胞抽出液を調製し、それより粗酵素液を調製してDDPS活性が増大していることを確認することにより達成できる。DDPSの酵素活性測定法は、Yugariらの方法により行うことができる(Yugari, Y. and Gilvarg, C., J. Biol. Chem., 240, 4710 (1962))。

そして、上記菌株より、DDPS遺伝子を含有するDNAがベクターDNAに挿入された組換えDNAを、例えばP. Guerryらの方法(J. Bacteriol., 116, 1064, (1973))、D. B. Clewellの方法(J. Bacteriol., 110, 667, (1972))などにより単離することができる。

野生型DDPS遺伝子の取得は、染色体上にDDPS遺伝子を有する株から、

斎藤、三浦の方法等により染色体DNAを調製し、ポリメラーゼチェーンリアクション法（PCR：polymerase chain reaction：White, T. J. et al ;Trends Genet., 5, 185 (1989)参照）により、DDPS遺伝子を増幅することによっても行える。増幅反応に用いるDNAプライマーは、DDPS 遺伝子の全領域あるいは一部領域を含有するDNA二重鎖の両3'末端に相補するものを用いる。DDPS 遺伝子の一部領域だけを増幅した場合には、該DNA断片をプライマーとして全領域を含むDNA断片を染色体DNAライブラリーよりスクリーニングする必要がある。DDPS 遺伝子の全領域を増幅した場合には、増幅されたDDPS 遺伝子を含有するDNA断片を含むPCR反応液をアガロースゲル電気泳動に供した後、目的のDNA断片を抽出することによって DDPS 遺伝子を含有するDNA断片を回収できる。

DNAプライマーとしては、例えば*E. coli*において既知となっている配列（Richaud, F. et al., J. Bacteriol., 297(1986)）を基にして適宜作成すればよいが、具体的には、DDPS 遺伝子をコードする1150塩基からなる領域を増幅できるプライマーが好ましく、配列番号1及び2に示した2種のプライマーが適当である。プライマーDNAの合成は、ホスホアミダイト法（Tetrahedron Letters, 22, 1859(1981)参照）等の常法により、市販のDNA合成装置（例えば、Applied Biosystems社製DNA合成機 model 380B等）を用いて行うことができる。また、PCR反応は、市販のPCR反応装置（宝酒造（株）製DNAサーマルサイクラー PJ2000型等）を使用し、TaqDNAポリメラーゼ（宝酒造（株）より供給されている）を用い、供給者により指定された方法に従って行うことができる。

PCR法により増幅されたDDPS 遺伝子は、エシェリヒア属細菌細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続し、エシェリヒア属細菌細胞に導入することによって、DDPS 遺伝子への変異の導入などの操作がしやすくなる。用いられるベクターDNAと形質転換法、さらに DDPS 遺伝子の存在の確認方法は上述した方法と同じである。

セラチア属細菌由来のDDPS 遺伝子は、上記と同様にしても取得できるが、セラチア属細菌染色体DNAライブラリーから、*E. coli*由来のDDPS 遺伝子又はその一部をプローブとするハイブリダイゼーションによっても単離できる。ま

た、セラチア属細菌染色体DNAを鋳型とし、*E. coli*由来のDDPS遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチド、例えば配列番号1及び2に示した2種の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR法によってもセラチア属細菌由来のDDPS遺伝子が得られる。

セラチア属細菌はエシェリヒア属細菌と近縁であり、両細菌の間では、細胞に含まれるタンパク質のアミノ酸配列及び遺伝子の塩基配列の相同性が高いことが知られている。このような遺伝子としては、例えば、*thrA*、*thrB*、*thrC*が知られており、相同性は各々83%、73%及び84%である(K. Omori et al. *J. Bacteriol.* 175, 785-794(1993))。また、エシェリヒア属細菌由来の遺伝子配列を利用してセラチア属細菌の遺伝子を単離した例としては、*dnaA*が知られている(O. Skovgaard and F. G. Hansen *J. Bacteriol.* 169, 3976-3981(1987))。したがって、エシェリヒア属細菌のDDPS遺伝子の塩基配列を基に、ハイブリダイゼーション法やPCR法によってセラチア属細菌のDDPS遺伝子を単離できる可能性は極めて高い。

## (2) DDPS遺伝子への変異の導入

上記のようにして得られたDDPS遺伝子に、アミノ酸残基の置換、挿入および欠失等の変異を実施する方法としては、リコンビナントPCR法(Higuchi, R., 61, in *PCR Technology* (Erlich, H. A. Eds., Stockton press(1989)))、部位特異的変異法(Kramer, W. and Frits, H. J., *Meth. in Enzymol.*, 154, 350 (1987)); Kunkel, T. A. et al., *Meth. in Enzymol.*, 154, 367(1987))などがある。これらの方法を用いると、目的部位に目的の変異を起こすことができる。

また、目的遺伝子を化学合成する方法によれば、目的部位への変異、あるいはランダムな変異を導入することができる。

さらに、染色体もしくはプラスミド上のDDPS遺伝子を直接ヒドロキシルアミンで処理する方法(Hashimoto, T. and Sekiguchi, M., *J. Bacteriol.*, 159, 1039 (1984))がある。また、DDPS遺伝子を保有するエシェリヒア属細菌を紫外線照射する方法またはN-メチル-N'-ニトロソグアニジンもしくは亜硝酸などの化学薬剤処理による方法を用いてもよい。これらの方法によれば、ランダムに変異

を導入できる。

変異型遺伝子の選択方法としては、まずDDPS遺伝子を含有するDNA断片とベクターDNAからなる組換えDNAを、直接ヒドロキシルアミン等で変異処理し、これで例えば *E. coli* W3110 株を形質転換する。次にL-リジンのアナログである、S-2-アミノエチルシステイン(AEC)を含む最少培地、例えばM9に形質転換株を培養する。野生型のDDPS遺伝子を含有する組換えDNAを保持する株は、その組換えDNAにより発現されるDDPSがAECにより阻害されるために、L-リジン及びジアミノピメリン酸(DAP)の合成が出来なくなり生育が抑えられる。これに対し、L-リジンによる阻害の解除されたDDPS遺伝子を含有する組換えDNAを保持する株は、同組換えDNA中のDDPS遺伝子にコードされる変異酵素がAECによる阻害を受けないので、AECが添加された最少培地上での生育が可能になるはずである。この現象を利用し、生育が、L-リジンのアナログであるAECに耐性となっている株、すなわち阻害の解除された変異型DDPS遺伝子を含有する組換えDNAを保持する株を選択することができる。

こうして得られた該変異型遺伝子を、組換えDNAとしてセラチア属細菌に導入し、発現させることによりフィードバック阻害が解除されたDDPSを保有させることができる。また、組換えDNAから変異型DDPS遺伝子断片を取り出し、他のベクターDNAに挿入したものを使用してもよい。本発明において用いることのできることのできるベクターDNAとしては、プラスミドベクターDNAが好ましく、例えばpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等が挙げられる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。

さらに、変異型DDPS遺伝子の発現を効率的に実施するために、変異型DDPSをコードするDNA配列の上流に、*lac*、*trp*、*PL*等のセラチア属細菌細胞内で働く他のプロモーターを連結してもよく、DDPS遺伝子に含まれるプロモーターをそのまま、あるいは増幅して用いてもよい。

< 2 > 本発明に用いる変異型アスパルトキナーゼをコードするDNA

本発明に用いる変異型AKをコードするDNAは、野生型AKをコードするDNAにおいて、コードされるAKのL-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するものである。AKとしては、エシェリヒア属細菌、由来のもの、特にE. coli由来のAKIIIが挙げられる。また、セラチア属細菌自体のアスパルトキナーゼであっても、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するものであれば、用いることができる。

エシェリヒア属細菌由来のAKIIIのL-リジンによるフィードバック阻害を解除する変異としては、配列表の配列番号8に示すAKIIIのアミノ酸配列中、AKIIIのN-末端から

- (イ)323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、
  - (ロ)323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させかつ408番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、
  - (ハ)34番目のアルギニン残基をシステイン残基に置換させかつ323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、
  - (ニ)325番目のロイシン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、
  - (ホ)318番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、
  - (ヘ)318番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ349番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、
  - (ト)345番目のセリン残基をロイシン残基に置換させる変異、
  - (チ)347番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、
  - (リ)352番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、
  - (ヌ)352番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ369番目のセリン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、
  - (ル)164番目のグルタミン酸残基をリジン残基に置換させる変異、
  - (ヲ)417番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ419番目のシステイン残基をチロシン残基に置換させる変異、
- が挙げられる。

野生型AKIIIをコードするDNAとしては、例えばE. coli由来のAKIIIをコ

ードするDNAが挙げられ、具体的には配列番号8に示すアミノ酸配列をコードするDNA、さらには配列番号7に示す塩基配列のうち、塩基番号584～1930で表される配列が挙げられる。尚、E. coliのAKIIIは、lysC遺伝子にコードされている。

これらの配列において、上記アミノ酸残基の置換を起こすような塩基配列の変異を有するものが、本発明に用いる変異型AKIIIをコードするDNAの例である。尚、置換されたアミノ酸残基に対応するコドンは、そのアミノ酸残基をコードするものであれば種類は特に問わない。また、菌種や菌株の違いにより保持する野生型AKIIIのアミノ酸配列がわずかに相異なるものがある。このような酵素の活性に関与しない位置でのアミノ酸残基の置換、欠失あるいは挿入を有するものも本発明に用いる変異型AKIII遺伝子に含まれる。例えば、後記実施例2で得られた野生型lysC遺伝子の塩基配列（配列番号7）は、既に発表されている E. coli K-12 JC411株のlysCの配列（Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G. N., and Patte, J. C., J. Biol. Chem., 261, 1052(1986)）と6ヶ所相違しており、そのうち2ヶ所でコードされるアミノ酸残基が異なっている（JC411株のlysCは、配列番号8に示すlysCのアミノ酸配列中、N-末端から58番目のグリシン残基がシステイン残基に、401番目のグリシン残基がアラニン残基に置き換わっている）。このE. coli K-12 JC411株のlysCと同一の配列を有するlysCであっても、上記(イ)～(㍻)のいずれかの変異を導入すれば、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するlysCが得られることが予想される。

リジンによるフィードバック阻害が解除された変異型AKをコードするDNAを取得する方法は以下の通りである。まず、野生型AK遺伝子又は他の変異を有するAK遺伝子を含有するDNAをインビトロ変異処理し、変異処理後のDNAと宿主に適合するベクターDNAとを連結して組換えDNAを得る。組換えDNAを宿主微生物に導入して形質転換体を得、同形質転換体のうちで変異型AKを発現するように至ったものを選択すれば、同形質転換体の変異型遺伝子を保持している。また、野生型AK遺伝子又は他の変異を有するAK遺伝子を含有するDNAを、宿主に適合するベクターDNAと連結して組換えDNAを得て、その後組換えDNAをインビトロ変異処理し、変異処理後の組換えDNAを宿主微生物



に導入して形質転換体を得、同形質転換体のうちで変異型AKを発現するように至ったものを選択しても、同形質転換体は変異型遺伝子を保持している。

あるいは、野生型酵素を生産する微生物を変異処理し、変異型酵素を生産する変異株を創成した後、該変異株から変異型遺伝子を取得してもよい。DNAを直接変異処理するための薬剤としては、ヒドロキシルアミン等が挙げられる。ヒドロキシルアミンは、シトシンをN<sup>4</sup>-ヒドロキシシトシンに変えることによりシトシンからチミンへの変異を起こす化学変異処理剤である。また、微生物自体を変異処理する場合は、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等の通常人工突然変異に用いられている変異剤による処理を行う。

上記野生型AK遺伝子あるいは他の変異を有するAK遺伝子を含むDNAの供与菌としては、エシェリヒア属又はセラチア属に属する微生物であればいかなるものを用いてもかまわない。具体的にはナイトハルトらの著書 (Neidhardt, F. C. et. al., *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D. C., 1208, table 1) にあげられるものが利用できる。たとえば、*E. coli* JM109株や、MC1061株などがあげられる。また、セラチア属に属する微生物としては、セラチア・マルセッセンス、例えばセラチア・マルセッセンス AJ13125株 (FERM BP-5441) 等が挙げられる。

これらの株からAK遺伝子を取得するに際し、染色体DNAの調製、染色体DNAライブラリーの作製等は、上記のDDPS遺伝子の取得と同様に行えばよい。ライブラリー作製に用いる宿主としては、AK I、II、III全欠損株、例えば*E. coli* GT3株 (*E. coli* Genetic Stock Center (米国コネチカット州) 等から入手できる) 等を用いることが好ましい。

得られた染色体DNAライブラリーの内、AK活性が増大した株あるいは栄養要求性が相補された株としてAK遺伝子の組換えDNAをもつ菌株を得る。候補株から細胞抽出液を調製し、それより粗酵素液を調製してAK活性を確認する。AKの酵素活性測定法は、スタットマンらの方法により行うことができる (Stadtmann, E. R., Cohen, G. N., LeBras, G., and Robichon-Szulmajster, H., *J. Biol. Chem.*, 236, 2033(1961))。

例えば、AK完全欠損変異株を宿主に用いた場合は、L-リジン、L-スレオ

ニン、L-メチニオンおよびジアミノピメリン酸を含有しない培地上で、またはホモセリンおよびジアミノピメリン酸を含有しない培地上で生育可能となった形質転換株を単離し、該菌株から組換えDNAを回収することにより、AK遺伝子を含有するDNA断片を得ることができる。

尚、PCR法により染色体DNAからAK遺伝子を増幅する場合には、PCR反応に用いるDNAプライマーとしては、例えば*E. coli*において既知となっている配列（Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G. N., and Patte, J. C., *J. Biol. Chem.*, 261, 1052(1986)）を基にして適宜作成できるが、*lysC*遺伝子をコードする1347塩基からなる領域を増幅できるプライマーが適当であり、例えば配列番号5及び6に示す配列を有する2種のプライマーが適当である。

また、セラチア属細菌由来のAK遺伝子は、上記と同様にしても取得できるが、セラチア属細菌染色体DNAライブラリーから、*E. coli*由来のAK遺伝子又はその一部をプローブとするハイブリダイゼーションによっても単離できる。また、セラチア属細菌染色体DNAを鋳型とし、*E. coli*由来のAK遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR法によってもセラチア属細菌由来のAK遺伝子が得られる。

上記のようにして得られたAK遺伝子に、アミノ酸残基の置換、挿入および欠失等の変異を実施する方法としては、前記DDPS遺伝子の変異処理と同様に、リコンビナントPCR法、部位特異的変異法などがある。

また、目的遺伝子を化学合成する方法によれば、目的部位への変異、あるいはランダムな変異を導入することができる。

さらに、染色体もしくは染色体外の組換えDNA上のAK遺伝子DNAを直接ヒドロキシルアミンで処理する方法（Hashimoto, T. and Sekiguchi, M., *J. Bacteriol.*, 159, 1039(1984)）がある。また、染色体もしくは染色体外の組換えDNA上にAK遺伝子を保持するエシェリヒア属細菌を紫外線照射する方法、またはN-メチル-N'-ニトロソグアニジンもしくは亜硝酸などの化学薬剤で処理する方法を用いてもよい。

変異型AK遺伝子の選択方法としては、まず変異処理したAK遺伝子を含有する組換えDNAをAK完全欠損株、例えば*E. coli* GT3株に形質転換する。次に

著量のＬ－リジンを含む最少培地、例えばM9で形質転換株を培養する。野生型のAK遺伝子を含有する組換えDNAを保持する株は、唯一のAKがＬ－リジンにより阻害されるために、Ｌ－スレオニン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、及びジアミノピメリン酸(DAP)の合成が出来なくなり生育が抑えられる。これに対しＬ－リジンによる阻害の解除された変異型AK遺伝子を含有する組換えDNA保持株は、著量のＬ－リジンが添加された最少培地上での生育が可能になるはずである。この現象を利用し、生育が、Ｌ－リジンあるいはＬ－リジンのアナログであるAECに耐性となっている株、すなわち阻害の解除された変異型AK遺伝子を含有する組換えDNA保持株を選択することができる。

こうして得られた該変異型遺伝子を、組換えDNAとしてセラチア属細菌に導入し、発現させることによりフィードバック阻害が解除されたAKを保有させることができる。また、組換えDNAから変異AK遺伝子断片を取り出し、他のベクターに挿入したものを使用してもよい。本発明において用いることのできるベクターDNAとしては、プラスミドベクターDNAが好ましく、例えばpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等が挙げられる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。

さらに、変異型AK遺伝子の発現を効率的に実施するために、変異型AKをコードするDNAの上流に、lac、trp、PL等のセラチア属細菌細胞内で働く他のプロモーターを連結してもよく、AK遺伝子に含まれるプロモーターをそのまま、あるいは増幅して用いてもよい。

### < 3 > 本発明によるＬ－リジンの製造

上記のようにして得られる変異型DDPS遺伝子を導入することによって形質転換され、さらにＬ－リジンによるフィードバック阻害が解除されたAKを保持するセラチア属細菌を、好適な培地中で培養し、該培養物中にＬ－リジンを生産蓄積させ、該培養物からＬ－リジンを採取することにより、Ｌ－リジンを効率よく製造することができる。詳しくは、変異型DDPSと変異型AKとともにセラチア属細菌に保持させることによって、Ｌ－リジンを効率よく製造させることが

できる。

L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたAKを保持するセラチア属細菌としては、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するAKをコードするDNAとセラチア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターDNAとを連結してなる組換えDNAが細胞内に導入されることによって形質転換されたセラチア属細菌が挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたAKは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない野生型AKであってもよく、このような野生型AK遺伝子を同様にセラチア属細菌に導入したものでもよい。さらに、セラチア属細菌細胞を変異処理することにより、変異型AKを産生するようになったセラチア属細菌変異株であってもよい。

一方、変異型DDPS遺伝子をセラチア属細菌に導入することによって形質転換するには、変異型DDPS遺伝子とセラチア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターDNAとを連結してなる組換えDNAを細胞内に導入することによって形質転換すればよい。

変異型DDPS遺伝子及び変異型AK遺伝子の両方をセラチア属細菌に導入する場合には、これらの遺伝子は細胞内で単一のプラスミド上に保持されていてもよく、別々のプラスミド上に保持されていてもよい。別々のプラスミドを用いる場合には、各々が安定して細胞内に保持されるような安定分配機構を有するプラスミドを用いることが好ましい。変異型DDPS遺伝子及び変異型AK遺伝子を別々のプラスミドを用いてセラチア属細菌に導入するに際しては、両遺伝子の導入の順序は問わない。

変異型DDPS遺伝子及び変異型AK遺伝子を導入されたセラチア属細菌においてジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子(dapB)を増強することにより、L-リジン生産性を一層向上させることができる。さらに、変異型AK遺伝子及び変異型DDPS遺伝子を保持し、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子が増強されたセラチア属細菌に、コリネ型細菌由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(DDH)を導入することによって、より一層L-リジン生産性を向上させることができる。このジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子は増強

されている必要がある。また、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入する代わりに、スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ遺伝子 (dapD) 及びスクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ遺伝子 (dapE) を増強することによっても、同程度にL-リジン生産性を向上することができる。

ここで、遺伝子の増強とは、その遺伝子の発現産物である酵素の細胞当たりの活性を増強することをいう。具体的には、例えば、該遺伝子の細胞内コピー数を高めること、発現効率のよいプロモーターを用いて遺伝子当たりの発現量を高めること、酵素活性を高める変異を該遺伝子に導入することなどが挙げられる。細胞内の遺伝子のコピー数を高めるには、セラチア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターに該遺伝子を挿入し、このベクターでセラチア属細菌を形質転換すればよい。このベクターはマルチコピー型のプラスミドであることが好ましい。また、Muファージ等を用いて染色体DNAに組み込んだDNAを増幅することによりコピー数を増加させてもよい。

プラスミドを用いる際に、変異型DDPS遺伝子及び変異型AK遺伝子の導入にプラスミドを用いた場合には、これらのプラスミドが共に安定して細胞内に保持されるような安定分配機構を有するプラスミドを用いることが好ましい。尚、各遺伝子の導入の順序は問わない。

*E. coli* のL-リジン生合成系遺伝子、及びコリネ型細菌DDH遺伝子は、以下のようにして取得することができる。

DDH遺伝子は、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) のDDH遺伝子の既知のヌクレオチド配列 (Ishino, S. et al., *Nucleic Acids Res.*, 15, 3917 (1987)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (例えば、配列番号9、10) を用いたPCR法により、ブレヴィバクテリウム ラクトファーマンタム等のコリネ型細菌の染色体DNAを増幅することによって得られる。

dapD遺伝子は、既知のdapD遺伝子のヌクレオチド配列 (Richaud, C. et al., *J. Biol. Chem.*, 259, 14824 (1984)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (例えば、配列番号11、12) を用いたPCR法により、*E. coli* W3110株染色体DNAを増幅することによって得られる。

dapE遺伝子は、既知のdapE遺伝子のヌクレオチド配列 (Bouvier, J. et al., J. Bacteriol., 174, 5265 (1992)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (配列番号13、14) を用いたPCR法により、E. coli DNAを増幅することによって得られる。

本発明において宿主として用いるセラチア属細菌としては、その細胞内で変異型DDPS遺伝子及び変異型AKIII遺伝子、もしくは他のL-リジン生合成系遺伝子のプロモーター又はこれらの遺伝子を発現させるための他のプロモーターが機能し、さらに変異型DDPS遺伝子、変異型AKIII遺伝子、あるいは他のL-リジン生合成系遺伝子をプラスミド上に染色体外DNAとして導入する場合には、導入するのに用いるベクターDNAの複製起点が細胞内で機能して複製可能なものであれば利用できる。

本発明に使用できるセラチア属細菌としては、たとえばL-スレオニン生産菌が挙げられる。L-スレオニン生産菌は、一般的にはそのアスパルトキナーゼのL-スレオニンによる阻害が解除されているからである。セラチア・マルセッセンスのL-スレオニン生産菌としては、スレオニンアナログであるAHV ( $\alpha$ -アミノ- $\beta$ -ヒドロキシ吉草酸) に耐性な菌が知られている (S. Komatsubara, M. K. isumi and I. Chiba, Appl. Environ. Microbiol., 35, 834 (1978))。そのような株として、セラチア・マルセッセンス AJ13125株がある。当該菌株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に、1995年6月12日よりFERM P-14983の受託番号で寄託され、1996年3月4日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-5441の受託番号が付与されている。

また、本発明に使用できるセラチア属細菌として、リジンデカルボキシラーゼが欠損したセラチア・マルセッセンス (特開昭50-53589号公報参照) が挙げられる。リジンデカルボキシラーゼは、L-リジン分解酵素として、L-リジンの脱炭酸によりカダベリンを生成する反応を触媒する酵素であり、これを欠損する株はL-リジンの分解が抑制される。

上記のようなL-スレオニン生産菌及びリジンデカルボキシラーゼを欠損する

セラチア属細菌は、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤による処理を行うことによって取得できる。

セラチア属細菌への組換えプラスミドの導入は、大腸菌の形質転換法として知られている方法、例えばD. M. Morrisonの方法 (Methods in Enzymology 68, 326 (1979)) あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) 等と同様にして行うことができる。

本発明による変異型遺伝子を保持する形質転換体の培養に使用する培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。

炭素源としては、スクロース、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースもしくはでんぷんの加水分解物などの糖類、グリセロールもしくはソルビトールなどのアルコール類、またはフマル酸、クエン酸もしくはコハク酸等の有機酸類を用いることができる。

窒素源としては、尿素、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムもしくはリン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、またはアンモニア水等を用いることができる。

有機微量栄養源としては、ビタミンB<sub>1</sub>、L-イソロイシンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

培養は、好氣的条件下で16～96時間実施するのがよく、培養温度は25℃～45℃に、培養中pHは5～8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

発酵液からのL-リジンの採取は通常イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、pdapA1 と pdapA2 の製造工程を示す図である。

図 2 は、野生型及び変異型 D D P S の L - リジンによる阻害を示す図である。

図 3 は、二重変異型 dapA\* 遺伝子を有するプラスミド pdapAS824 の製造工程を示す図である。

図 4 は、pLYSC1 と pLYSC2 の製造工程を示す図である。

図 5 は、ヒドロキシルアミン処理後の形質転換体の出現率と変異率を示す図である。

図 6 は、野生型及び変異型 A K III の L - リジンによる阻害を示す図である。

図 7 は、dapA\*24 を有する RSF1010 由来のプラスミド RSF24P の製造工程を示す図である。

図 8 は、プラスミド p L L C \* 8 0 の製造工程を示す図である。

図 9 は、dapA\*24 及び lysC\*80 を有する RSF1010 由来のプラスミド RSFD80 の製造工程を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。

#### 実施例 1 変異型 D D P S 遺伝子の取得

##### < 1 > 野生型 dapA 遺伝子のクローニング

E. coli の dapA 遺伝子の塩基配列は既に報告されており (Richaud, F. et al., J. Bacteriol., 297(1986))、オープンリーディングフレーム(ORF)は 876 塩基対であり、292 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていることがわかっている。この dapA 遺伝子がどのように調節されているか不明であるため、プロモーター領域を除き、S D 配列と ORF のみを含む領域を PCR 法を用いて増幅し、クローニングすることにした。

E. coli K-12 MC1061 株の全ゲノム DNA を斎藤、三浦の方法 (Biochem. Bioph



ys. Acta., 72, 619(1963)) により回収し、配列番号 1 及び 2 に示す配列を有する 2 種のプライマーを作製し、これらを用いて、エルリッチらの方法 (PCR Technology, Stockton press (1989)) に従って PCR 反応を行い、目的 DNA の増幅を行った。得られた DNA をそのまま市販の PCR 断片用クローニングベクター pCR1000 (Invitrogen 社 (米国カルフォルニア州) より購入) に挿入した。pCR1000 は lacZ プロモーター (Placz) を含有しており、lacZ プロモーターの下流の部位で切断した状態で市販されている。この pCR1000 の両切断末端の間に PCR 断片を連結して得られる組換え DNA を *E. coli* に導入すると、lacZ プロモーター制御下で PCR 断片が転写される。PCR 断片を pCR1000 に連結する際、この lacZ プロモーターによる転写方向に対して dapA の転写の向きが正方向となるように連結されたプラスミドとして pdapA1、逆方向となるように連結されたプラスミドとして pdapA2 の 2 種のプラスミドを得た (図 1)。

これらのプラスミドを DDP S 欠損株である *E. coli* JE7627 に導入したところ、プラスミドを導入された株は宿主である JE7627 のジアミノピメリン酸の要求性が相補されたので、両プラスミドに挿入された DNA 断片は、活性のある DDP S をコードする遺伝子 dapA を含有すると確認した。

pdapA1 を野生型 *E. coli* W3110 株 (国立遺伝学研究所 (日本国静岡県三島市) から入手) に導入して得られる形質転換株を W3110/pdapA1、pdapA2 を *E. coli* W3110 株に導入して得られる形質転換株を W3110/pdapA2 とそれぞれ命名した。そして以下の組成を有する最少培地 M9 にリジンのアナログである AEC を加え、これら 2 種の形質転換株をそれぞれ培養した。コントロールとしてプラスミドを導入していない W3110 株も同培地で培養した。2 種の形質転換株もプラスミドを持たない W3110 株も、AEC により生育が抑えられたが、その生育阻害は L-リジンの添加によって回復した。

(最小培地 M9)

A : (20×M9)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O 303 g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 g/L

NaCl 10 g/L

NH<sub>4</sub>Cl 20 g/L

B : 1M MgSO<sub>4</sub>

C : 50% Glucose

D : 1g/L Thiamine

上記A、B、C、Dを別々に滅菌し、A : B : C : D : 水 = 5:0.1:1:0.1:95 の割合で混合する。

#### < 2 > 変異型DDPS遺伝子(dapA\*)の取得

L-リジンによる阻害が解除されたDDPSをコードするdapA\*を含有するプラスミド保持株は、著量のAECが添加された最少培地M9上での生育が可能になると予想し、生育がAECに耐性となっている株を選択することによって、dapA\*を含有するプラスミド保持株を選択することにした。

dapA\*を効率よく取得するために、< 1 >で作製したpdapA1およびpdapA2上のdapAに変異処理を行なうことにした。

#### (1-2-1) dapA\*を含有するプラスミド保持株の選択条件の検討

上記で得られたW3110/pdapA1株およびW3110/pdapA2株を、それぞれ種々の濃度のAECを含有するM9寒天平板培地上で培養した。そしてAECによる生育阻止濃度を調べ、dapA\*を含有するプラスミド保持株の選択条件の検討を行なった。

各種濃度でAECを含むM9培地での形質転換体の生育を表1に示す。尚、表中の+は形質転換株が生育することを示し、-は生育しなかったことを示す。

表 1

AEC濃度(mM)	W3110/pdapA1	W3110/pdapA2
250	—	—
125	—	—
60	—	—
30	—	—
15	+	—
8	+	+
4	+	+
2	+	+

pdapA1上のdapA遺伝子の転写方向はlacZプロモーターによる転写の方向と一致している（図1）。よってpdapA1上のdapA遺伝子はlacZプロモーターにより発現量が増幅されているため、dapAが野生型のままだでもかなり高濃度のAECに耐性であったが、pdapA2上のdapA遺伝子は転写方向がlacZプロモーターに対して逆方向であり、dapA自身のプロモーターも欠失しているため発現量が少なく、より低濃度のAECで生育が阻害されることがわかった（W3110/pdapA1株では30mM、W3110/pdapA2株では15mMの添加区で生育が抑えられた）。なお、この生育阻害はL-リジンの同時添加により消去されることを確認した。

したがって、変異導入対象にはpdapA2を用い、最少培地M9にAECを60mM添加したものを、dapA\*を含有するプラスミド保持株の選択に用いた。以下、実施例1においてこの培地を選択培地という。

#### (1-2-2) ヒドロキシルアミンによるpdapA2のインビトロ変異処理

pdapA2プラスミドへの変異の導入には、プラスミドを直接ヒドロキシルアミンで処理するインビトロ変異処理法を用いた。

2  $\mu$ gのDNAを0.4Mヒドロキシルアミン中（0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -1mM EDTA（pH6.0）100  $\mu$ l、1M ヒドロキシルアミン-1mM EDTA（pH6.0）80  $\mu$ l、DNA 2  $\mu$ g、水を加えて計200  $\mu$ lとする）で、75℃で1～4時間処理した。処理後のDNAをガラスパ

ウダーで精製後、E. coli W3110に導入し、完全培地 (L-broth: 1% Bacto trypton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar) に撒き、コロニーを形成させた。これらを (1-2-1) で述べた選択培地にレプリカし、選択培地上でコロニーを形成するものを選択した。2度の実験で合計36株の変異プラスミドの候補が得られた。

こうして得られた候補株合計36株を、再度選択培地にスポットし、AEC耐性を確認した。

#### (1-2-3) dapA\*遺伝子の単離及びdapA\*産物の検討

上記36株から変異型pdapA2を回収し、これらと野生型pdapA2のそれぞれでdapA欠損株 JE7627を形質転換し、各形質転換株から無細胞抽出液を調製し、DDPSの酵素活性を測定した。

無細胞抽出液 (粗酵素液) は次のようにして調製した。形質転換株を2×TY培地 (1.6% Bacto trypton, 1% Yeast extract, 0.5% NaCl) で培養し、660nmにおける濁度 (OD<sub>660</sub>) が約0.8になったところで集菌した。菌体を0℃の条件下で、0.85%NaClで洗浄し、20mMリン酸カリウム緩衝液 pH7.5-400mM KClに懸濁し、超音波処理 (0℃, 200W, 10分) で菌体を破碎した。菌体破碎液を0℃の条件下で、33krpmで1時間遠心し、上清をとってこれに80%飽和になるよう硫酸を添加し、0℃で一夜保存した後遠心し、ペレットを20mMリン酸カリウム緩衝液 pH7.5-400mM KClに溶解した。

DDPS酵素活性の測定は、Yugariらの方法 (Yugari, Y. and Gilvarg, C. J. Biol. Chem. 240, 4710(1962)) で行った。即ち下記組成の反応液の吸光度を、37℃で分光光度計中で経時的に270nmの波長で測定し、生じるジヒドロジピコリン酸を測定した。ブランクとしては反応系からピルビン酸ナトリウムを除いたものとした。

## (反応液組成)

50mM イミダゾール-HCl pH7.4  
20mM L-アスパラギン酸セミアルデヒド  
20mM ピルビン酸ナトリウム  
酵素液  
水 (バランス)

計 1.0ml

DDPSの酵素活性を測定する際、酵素反応液中に種々の濃度のL-リジンを加え、L-リジンによる阻害の度合を調べた。図2に示す様に、野生型DDPSはL-リジンによる阻害を受けた。野生型に比べてL-リジンによる阻害を受けにくくなったDDPSを有する形質転換株由来の変異プラスミドは、候補プラスミド36種中3種類であった。これらをそれぞれ、pdapAS8、pdapAS9およびpdapAS24と命名した。後の塩基配列の決定でpdapAS8とpdapAS9は同一変異を有することが判明した。

pdapAS8、pdapAS9およびpdapAS24上のdapA\*にコードされる3種の変異型DDPSのL-リジンによる阻害の解除の度合は様々ではあったが、3種ともL-リジンによる阻害が解除されていた。酵素の比活性は、菌体の生育状況や試料の調製に影響されるが、いずれも野生型より若干の低下が見られた。しかし、育種素材としては実質的に問題となる程ではないと判断した。

## (1-2-4) 変異型dapA遺伝子の塩基配列の決定

DNAシーケンサー ABI Model 373A (Applied Biosystems社製) を使用して、常法に従い、変異型dapA遺伝子の塩基配列の決定を行った。その結果、配列番号3に示す野生型dapA遺伝子の配列上で、pdapAS8及びpdapAS9は、487番目のCがTに、pdapAS24は597番目のCがTに変化していることが明かとなった。従って配列番号4に示すDDPSのアミノ酸配列において、pdapAS8及びpdapAS9のコードするDDPSは、81番目のアラニン残基がバリン残基に、pdapAS24のコードするDDPSは、118番目のヒスチジン残基がチロシン残基に変化していることが明かとなった。

#### (1-2-5) 二重変異型dapAの作製

上述のように2種類の変異型dapA遺伝子が得られた。これらの変異は阻害の解除が相加的に働くかどうかを検証するために、2つの変異を同時に持つ変異型dapAを含有するプラスミドを作成した。作成の手順は図3に示す通りである。得られた二重変異プラスミドをpdapAS824と命名した。

#### 実施例2 変異型AKIII遺伝子の取得

##### < 1 > 野生型lysC遺伝子のクローニング

*E. coli*のAKIII遺伝子(lysC)の塩基配列は既に報告されており(Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G. N., and Patte, J. C., *J. Biol. Chem.*, 261, 1052(1986))、オープンリーディングフレーム(ORF)は1347塩基対よりなり、449アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていることがわかっている。この遺伝子にはオペレーターが存在しL-リジンによる抑制を受けるため、このオペレーター領域を除くために、SD配列とORFのみを含む領域を、PCR法を用いて増幅し、クローニングすることにした。

*E. coli* K-12 MC1061 株の全ゲノムDNAを斎藤、三浦の方法(*Biochem. Biophys. Acta.*, 72, 619(1963))により調製し、配列番号5及び6に示す配列を有する2種のプライマーを作製し、これらを用いてエルリッチらの方法(PCR Technology, Stockton press (1989))に従ってPCR反応を行い、lysC遺伝子の増幅を行った。得られたDNAをBamHIとAseIで消化した後、平滑末端にし、多コピーベクター-pUC18のSmaI部位に挿入した。このSmaI部位はベクター内に存在するlacZプロモーターの下流側に位置しており、pUC18のSmaI部位にDNA断片を挿入して得られる組換えDNAを*E. coli*に導入すると、lacZプロモーター制御による読み越し(リードスルー)転写により、挿入されたDNA断片が転写される。pUC18のSmaI部位にPCR断片を挿入する際、pUC18に含まれているlacZプロモーターによる転写方向に対してlysCの転写の向きが逆方向となるように挿入されたプラスミドとしてpLYSC1と、正方向となるように挿入されたプラスミドとしてpLYSC2の2種のプラスミドを得た(図4)。

これらのプラスミドでAKI、II、III完全欠損株であるE. coli GT3 (thrA101 6b, metLM1005, lysC1004) を形質転換したところ、GT3のホモセリンおよびジアミノピメリン酸の要求性が相補されたので、両プラスミドに挿入されたDNA断片は、活性のあるAKIIIをコードする遺伝子lysCを含有すると確認した。

pLYSC1をAK完全欠損株E. coli GT3に導入して得られる形質転換株をGT3/pLYSC1、pLYSC2をE. coli GT3に導入して得られる形質転換株をGT3/pLYSC2と命名した。最少培地M9に著量のL-リジンを加え、GT3/pLYSC1株およびGT3/pLYSC2株をそれぞれ培養した。GT3/pLYSC1株およびGT3/pLYSC2株ともに野生型のlysCを含有するプラスミドを保持し、同プラスミド上のlysCにコードされるAKIIIが唯一のAKである。著量のL-リジン存在下では唯一のAKである野生型AKIIIがL-リジンにより阻害されるために、両株ともL-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニン、及びジアミノピメリン酸(DAP)の合成ができなくなり生育が抑えられた。

#### < 2 > 変異型AKIII遺伝子 (lysC\*) の取得

L-リジンによる阻害の解除されたAKをコードするlysC\*を含有するプラスミド保持株は、著量のL-リジンが添加された最少培地M9上での生育が可能になると予想し、生育がL-リジンあるいはL-リジンのアナログであるAECに耐性となっている株を選択することによって、lysC\*を含有するプラスミド保持株を選択することにした。

lysC\*を効率よく取得するために、< 1 > で作製したpLYSC1およびpLYSC2上のlysCに変異処理を行なうことにした。

##### (2-2-1) lysC\*を含有するプラスミド保持株の選択条件の検討

GT3/pLYSC1株およびGT3/pLYSC2株をそれぞれ種々の濃度のL-リジンあるいはAECを含有するM9寒天平板培地上で培養を行なった。そしてL-リジンあるいはAECによる生育阻止濃度を調べ、lysC\*を含有するプラスミド保持株の選択条件の検討を行なった。

各種濃度でL-リジンあるいはAECを含むM9培地での形質転換体の生育を表2に示す。尚、表中の+は形質転換株が生育したことを示し、±はやや生育したこ

とを示し、－は生育しなかったことを示す

表 2  
L－リジン濃度と生育

	0	0.2	0.4	0.8	1.5	3	6	12	25	50	100	200 (mM)
GT3/pLYSC1	+	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
GT3/pLYSC2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	－

A E C 濃度と生育

	0	0.2	0.4	0.8	1.5	3	6	12	25	50 (mM)
GT3/pLYSC1	+	－	－	－	－	－	－	－	－	－
GT3/pLYSC2	+	±	±	±	±	±	－	－	－	－

pLYSC2上のlysC遺伝子の転写はlacZプロモーターによる転写の方向と一致している（図4）。よってpLYSC2上のlysC遺伝子はlacZプロモーターで発現量が増幅されているためlysCが野生型のままだでもかなり高濃度のL－リジン、AECに耐性であったが、pLYSC1上のlysC遺伝子は転写方向がlacZプロモーターに対して逆方向であり、自身のプロモーターも欠失しているため発現量が少なく、より低濃度のL－リジン、AECで生育が阻害されることがわかった（GT3/pLYSC2株ではL－リジンについては100mMの添加区まで、AECについては3mMの添加区まで生育が抑えられなかったのに対し、GT3/pLYSC1株ではL－リジン、AECとも0.2mMの添加区で生育が完全に抑えられた）。なお、この生育阻害はホモセリン及びジアミノピメリン酸の同時添加により消去されることを確認した。

したがって、変異導入実験にはpLYSC1を用い、最少培地M9にL－リジン10mM、もしくはAEC 0.2mMを添加したものを、lysC\*を含有するプラスミド保持株の選択に用いた。以下、実施例2においてこの培地を選択培地という。



(2-2-2) ヒドロキシルアミンによるpLYSC1のインビトロ変異処理

pLYSC1プラスミドへの変異の導入には、プラスミドを直接ヒドロキシルアミンで処理するインビトロ変異処理法に加え、変異に多様性を与えるため、即ちヒドロキシルアミンによるシトシンからチミンへの変異以外の変異を期待して、プラスミドを保持した菌体をニトロソグアニジン (NTG) で処理した後プラスミドを抽出するインビボ変異処理法の2種の方法を用いた。

(ヒドロキシルアミンによるインビトロ変異処理)

2 $\mu$ gのDNAを0.4M ヒドロキシルアミン中 (0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-1mM EDTA (pH6.0) 100 $\mu$ l、1M ヒドロキシルアミン-1mM EDTA (pH6.0) 80 $\mu$ l、DNA 2 $\mu$ g、水を加えて計200 $\mu$ lとする) で、75°Cの条件下で、1~4時間処理した。処理後のDNAをガラスパウダーで精製後、AK完全欠損株E. coli GT3株に導入し、完全培地 (L-broth: 1% Bacto trypton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar) に撒きコロニーを形成させた。これを(2-2-1)で設定した選択培地にレプリカし、選択培地上に生育可能な株を選択し候補株とした。形質転換体の出現率と変異率は図5のような推移がみられた。4時間処理では0.5~0.8%とかなり高率で変異株が得られた。

(NTGによるインビボ変異処理)

pLYSC1をE. coli MC1061に導入し、菌体ごとNTG処理をおこなった。処理後の菌体を一夜培養して変異を固定した後プラスミドを抽出し、E. coli GT3に導入した。すなわち、形質転換株を2 $\times$ TY培地 (1.6% Bacto trypton, 1% Yeast extract, 0.5% NaCl) で培養し、OD<sub>550</sub>が約0.3になったところで集菌し、下記に示すTM緩衝液 (TM buffer) で洗浄した後、NTG液 (0.2mg/mlの濃度でNTGをTM bufferに溶解させて調製) に懸濁し、37°Cで0~90分処理した。菌体をTM buffer及び2 $\times$ TY培地で洗浄後、2 $\times$ TY培地で一夜培養して変異を固定した後、菌体よりプラスミドDNAを抽出し、E. coli GT3株に導入し、候補株のスクリーニングをインビトロ変異と同様に行い、リジン耐性 (Lys<sup>r</sup>)、AEC耐性 (AEC<sup>r</sup>) の変異体を得た。

(TM buffer)

Tris	50mM
マレイン酸	50mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1g/L
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5mg/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25mg/L
NaOHを用いてpH6.0に調整	

上記で得られた候補株合計180株(ヒドロキシルアミン処理48株、NTG処理132株)を再度選択培地にスポットし、AEC及びL-リジン耐性を確認し153株を得た。培地中のアミノ酸蓄積パターンの違いに注目して、この153株を14群に分け各群の代表株を選んでAK活性を測定することにした。なお、ヒドロキシルアミン処理による変異株と、NTG処理による変異株の間ではAKの活性に大きな差はなかったので、それぞれを区別することなく以降の実験を行なった。

#### (2-2-3) lysC\*遺伝子の単離及びlysC\*産物の検討

上記14群の代表株として、No. 24, No. 43, No. 48, No. 60, No. 80, No. 117, No. 126, No. 149, No. 150, No. 156, No. 158, No. 167, No. 169, No. 172を選び、おののからpLYSC1に由来する変異型プラスミドを回収し、それぞれpLYSC1\*24, pLYSC1\*43, pLYSC1\*48, pLYSC1\*60, pLYSC1\*80, pLYSC1\*117, pLYSC1\*126, pLYSC1\*149, pLYSC1\*150, pLYSC1\*156, pLYSC1\*158, pLYSC1\*167, pLYSC1\*169, pLYSC1\*172と命名した。これらと野生型pLYSC1でAK完全欠損株GT3を形質転換し、各形質転換株から無細胞抽出液を調製し、AKIIIの酵素活性を測定した。

無細胞抽出液(粗酵素液)は次のようにして調製した。形質転換株を2×TY培地で培養し、OD<sub>660</sub>が約0.8になったところで集菌した。菌体を0℃の条件下、0.02M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH6.75)-0.03M β-メルカプトエタノールで洗浄し、超音波処理(0℃, 100W, 30秒×4)で菌体を破碎した。菌体破碎液を0℃の条件下、33krpmで1時間遠心し、上清をとりこれに80%飽和になるよう硫酸を添加し、遠心後ペレットを0.02M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH6.75)-0.03M β-メルカプトエタノールに溶解し、0℃で一夜保存した。

AKIII酵素活性の測定は、スタットマンらの方法にしたがった(Stadtman, E. R., Cohen, G. N., LeBras, G., and Robichon-Szulmajster, H., J. Biol. Chem., 236, 2033(1961))。すなわち、下記組成の反応液を27℃で45分インキュベートし、FeCl<sub>3</sub>溶液(2.8N HCl 0.4ml + 12%TCA 0.4ml + 5%FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O/0.1N HCl 0.7ml)を加え発色させ、これを遠心後、上清の540nmでの吸光度を測定した。活性は1分間に生成するヒドロキサム酸の量で表示(1U=1μmol/min)した。モル吸光係数は600とした。尚、反応液からアスパラギン酸カリウムを除いたものをブランクとした。

(反応液組成)

reaction mixture *1	0.3ml
ヒドロキシルアミン溶液 *2	0.2ml
0.1M アスパラギン酸カリ(pH7.0)	0.1ml
酵素液	
水	(バランス)
計	1.0ml

\*1; 1M Tris-HCl(pH8.1)9ml + 0.3M MgSO<sub>4</sub> 0.5ml + 0.2M ATP(pH7.0) 5ml

\*2; 8M ヒドロキシルアミン溶液を直前にKOHで中和したもの

AKの酵素活性を測定する際、酵素反応液中に種々の濃度のL-リジンを加え、L-リジンによる阻害の度合を調べた。結果を、図6及び表3に示した。尚、野生型及びNo. 24, 43, 48, 60, 80, 117, 126については図6Aに、No. 149, 150, 156, 158, 167, 169, 172については図6Bに示した。

この結果が示すように、野生型AKIIIはL-リジンによる阻害を非常に強く受け、L-リジン約0.45mMで50%阻害され、5mMになるとほぼ100%阻害された。それに対し、今回得られた変異型AKIIIは、解除の度合は様々ではあったが、14種ともL-リジンによる阻害が解除されていた。特にNo. 24, 80, 117, 169, 172では、L-リジン100mMでも阻害はほとんどみられず、50%阻害濃度は野生型のそれと比較して200倍以上であった。また総蛋白当りの比活性は、菌体の生育状況や試料の調製に影響されるが、いずれもほとんどが野生型と同等もしくはそれ以上のものであり、変異導入による活性低下の問題はほとんどなかった(表3)。このことより、AKIIIの活性中心とL-リジンによる調節部位がそれぞれ独立してい

ることが予想された。尚、表3中、阻害解除度(%)とは、反応液中L-リジン非存在下でのAK活性に対するL-リジン 100 mM存在下でのAK活性である。熱安定性(%)とは55℃で1.5時間処理後の活性保持率である。

表 3

	比活性(U/mg prot.)	阻害解除度(%) *1	熱安定性(%) *2
野生型	0.0247	0	18
No. 117	0.0069	120	0
No. 24	0.0218	100	30
No. 80	0.0244	99	36
No. 172	0.0189	97	0
No. 169	0.0128	96	2
No. 150	0.0062	77	25
No. 126	0.0250	61	39
No. 149	0.0256	59	9
No. 167	0.0083	43	45
No. 48	0.0228	38	42
No. 60	0.0144	35	9
No. 158	0.0224	22	42
No. 156	0.0101	18	2
No. 43	0.0212	17	0

\*1: L-リジン非存在下でのAK活性に対するL-リジン 100 mM 存在下でのAK活性(%)

\*2: 55℃で1.5時間処理後の活性保持率(%)

続いて変異型酵素の熱安定性を調べた。ある酵素を改良し活性を上げようとする場合、創成される酵素が細胞内で安定に保持されることが重要である。細胞内外でのプロテアーゼの活動の違いや、酵素をインビトロ保存するための保存用バッファーの影響などもあるため、インビトロの測定には問題もあるが、簡便のため1つのパラメーターとして変異型AKIIIの熱安定性についてインビトロで検討した。

A KIIIの失活温度を種々の条件で検討した結果から、55℃、90分処理後の活性保持率を測定することにした。表3に示すように、半数がむしろ野生型よりも優れていた。通常変異型酵素は野生型に比べ不安定なものが多いが、今回得られた変異型A KIIIには安定性が野生型を上回るものもあり、L-リジン生産の実用面でかなり有力と思われるものが多かった。

#### (2-2-4) 野生型lysCおよび変異型lysCの塩基配列の決定

DNA シークエンサー ABI Model 373A (Applied Biosystems社製) を使用して、常法に従い、今回取得した野生型lysC遺伝子の塩基配列の決定を行なった(配列番号7)。その結果、既に発表されている *E. coli* K-12 JC411株のlysCの配列 (Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G. N., and Patte, J. C., *J. Biol. Chem.*, 261, 1052(1986)) と6ヶ所(アミノ酸レベルでは2ヶ所)の相違があった。この6ヶ所の相違は使用菌株の違いによるものであると考えられる。

同様に、14種の変異型pLYSC1上にあるlysC\*それぞれについて塩基配列を決定し、変異点を明らかにした。結果を表4に示す。表中、( )内はヌクレオチドの変異に基づくアミノ酸残基の変異を示す。14種のうち全く同一の変異型が2組(No. 48とNo. 167、及びNo. 24とNo. 80)あったので、変異の種類は12種類であった。尚、No. 149, 150, 156, 158, 167, 169, 172 はヒドロキシルアミン処理、No. 24, 43, 48, 60, 80, 117, 126はNTG処理によって得た変異型であるが、変異のパターンはいずれもシトシンからチミンへの変異、あるいは裏鎖のシトシンからチミンへの変異による表鎖のグアニンからアデニンへの変異であった。

表4 lysC\*の変異点の特定

lysC*変異型	変異源*	変異点 (アミノ酸変化)
No. 126	N	GGT→GA*T ( <sup>323</sup> Gly→Asp)
No. 43	N	GGT→GA*T ( <sup>323</sup> Gly→Asp) GGC→GA*C ( <sup>408</sup> Gly→Asp)
No. 149	H	CGT→T*GT ( <sup>34</sup> Arg→Cys) GGT→GA*T ( <sup>323</sup> Gly→Asp)
No. 48/167	N/H	CTC→T*TC ( <sup>325</sup> Leu→Phe)
No. 150	H	ATG→ATA* ( <sup>318</sup> Met→Ile)
No. 172	H	<sup>775</sup> C→T (サイレント) ATG→ATA* ( <sup>318</sup> Met→Ile) GTG→A*TG ( <sup>349</sup> Val→Met)
No. 117	N	TCA→TT*A ( <sup>345</sup> Ser→Leu)
No. 158	H	GTG→A*TG ( <sup>347</sup> Val→Met)
No. 24/80	N/N	ACC→AT*C ( <sup>352</sup> Thr→Ile)
No. 169	H	<sup>923</sup> C→T (サイレント) ACC→AT*C ( <sup>352</sup> Thr→Ile) TCT→TT*T ( <sup>369</sup> Ser→Phe)
No. 60	N	<sup>859</sup> G→A (サイレント) GAA→A*AA ( <sup>164</sup> Glu→Lys)
No. 156	H	ATG→ATA* ( <sup>417</sup> Met→Ile) TGT→TA*T ( <sup>419</sup> Cys→Tyr) <sup>2014</sup> C→T (サイレント)

\* H ; ヒドロキシルアミン処理 N ; NTG処理

## 実施例3 dapA\*を導入した株によるL-リジンの発酵生産

エシェリヒア属細菌でL-リジンを生産させるためには、特開昭56-18596号公報、及び米国特許第4,346,170公報及びApplied Microbiology and Biotechnology, 15, p227-231(1982)に示されるように、DDPSを増強する宿主としては、アスパルトキナーゼがL-リジンによる阻害を受けなくなっているように変化している事が必須であるとされている。セラチア属細菌においても、エシェリヒア属細菌

菌と同様であるものと推定される。そのような株として、たとえばL-スレオニン生産菌があげられる。セラチア・マルセッセンスのL-スレオニン生産菌としては、スレオニンアナログであるAHV ( $\alpha$ -アミノ- $\beta$ -ヒドロキシ吉草酸)に耐性な菌が知られている (S. Komatsubara, M. Kisumi and I. Chiba, Appl. Environ. Microbiol., 35, 834 (1978))。そのような株として具体的には、セラチア・マルセッセンス AJ13125株がある。当該菌株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号 305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に、1995年6月12日よりFERM P-14983の受託番号で寄託され、1996年3月4日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-5441の受託番号が付与されている。

また、セラチア・マルセッセンスに導入するdapA\*としては、酵素の阻害解除度、比活性より判断して、pdapAS24に含まれているdapA\* (118番目のヒスチジン残基がチロシン残基に変異しているもの) を選択した。まず、dapA\*の発現量を増すためと、プラスミドの安定性を増すために、pdapAS24上にあった変異型dapA\* (以下、「dapA\*24」という) をpVIC40のテトラサイクリン耐性遺伝子プロモーターの下流に連結し、図7に示す様にしてRSF24Pを得た。

RSF24Pプラスミドを E. coli JM109株に導入したものは、AJ12395と命名され、1993年10月28日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号 305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に受託番号FERM P-13935として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4858の受託番号のもとで寄託されている。pdapAS8およびpdapAS9を保持する株は寄託しなかったが、各プラスミド上のdapA\*の変異点は前述の通りすべて明らかになっているので、上記寄託菌よりプラスミドをマニアティスらの方法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21(1989)) により回収し、サイト・ダイレクテッド・ミュータジェネシス法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15.63(1989)) により目的遺伝子を得ることは当業者にとり容易である。

RSF24Pプラスミドを常法にしたがいAJ13125株に導入し、AJ13125/RSF24Pを得た。AJ13125/RSF24PのL-リジン生産性について評価を行なった。

一方、コントロールのプラスミドとしてRSFPを構築した。すなわち、図7に示すpVIC40のBamHIおよびDraIによる二重消化物より大断片を選択し、これをDNAポリメラーゼ クレノー・フラグメントによって平滑末端化処理した。平滑末端化処理した大断片を自己連結させてプラスミドRSFPを得た。AJ13125株にRSFPを常法に従い導入し、AJ13125/RSFPを得た。AJ13125/RSFPについてもL-リジン生産性の評価を行った。

培養は、以下の培地を用い、培養時間72時間、温度30℃の条件下、攪拌114～116rpmで行った。結果を表5に示す。

(L-リジン生産培地)

A : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16 g/L  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L  
 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L  
 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L  
 MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.01 g/L  
 Yeast Ext. (Difco) 2 g/L  
 L-メチオニン 0.5 g/L  
 L-スレオニン 0.1 g/L  
 L-イソロイシン 0.05 g/L  
 KOHでpH7.0に調整し、115℃で10分  
 オートクレーブ (16/20容)

B : 20% スクロース  
 (115℃で10分オートクレーブ)(4/20容)

C : 局方 CaCO<sub>3</sub>  
 (180℃で2日間乾熱滅菌)(30g/L)

A : Bを4 : 1で混合し、1 Lに対してCを30 g加えて溶解し、抗生物質(ストレプトマイシン 200 μg/ml)を加える。

表 5

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量
AJ13125/RSF24P	3.5 g/L
AJ13125/RSFP	0 g/L



#### 実施例4 dapA\*及びlysC\*を導入した株によるL-リジンの発酵生産

実施例3で変異型DDPSのL-リジン生産に対する効果が示されたが、これをさらに改良するために、実施例2で得られた変異型AKIII遺伝子を変異型DDPS遺伝子と共存させる事とした。変異型DDPS遺伝子と共存させる変異型AKIII遺伝子としては、酵素活性、熱安定性等からNo. 80株由来のもの(lysC\*80)を選択した。

lysC\*80は、lysC\*の発現量を増すためにpLYSC1\*80上にあったlysC\* (以下、「lysC\*80」という)をpUC18に対して逆位の挿入部位を有するベクターpHSG399 (宝酒造社製)のlacZプロモーターの下流につなぎかえることにより作成されたプラスミドpLLC\*80 (図8) から切り出したものを使用した。pLLC\*80は、pLYSC1\*80上のlysC\*80が、転写方向がlacZプロモーターに対して逆方向に配置されているので、L-リジンの生産性を向上させるために、lacZプロモーターに対して転写方向が正方向となるようにlysC\*80を配置させるために作成されたプラスミドである。

pLLC\*80と、実施例3で得られたRSF24Pから、dapA\*及びlysC\*を有するプラスミドRSFD80を図9の様に作製した。RSFD80は、テトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター(tetP)の下流に、tetPに対して転写方向が正方向となるようにdapA\*24及びlysC\*80がこの順序で配置されている。

RSFD80プラスミドをE. coli JM109株に導入したものを、AJ12396と命名した。AJ12396は、1993年10月28日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。pLYSC1\*24, LYSC1\*43, pLYSC1\*48, pLYSC1\*60, pLYSC1\*117, pLYSC1\*126, pLYSC1\*149, pLYSC1\*150, pLYSC1\*156, pLYSC1\*158, pLYSC1\*167, pLYSC1\*169, pLYSC1\*172を保持する株は寄託しなかったが、各プラスミド上のlysC\*の変異点は前記の通りすべて明らかになっているので、上記寄託菌よりプラスミドをマニアティスらの方法(Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Mol

ecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1. 21(1989)) により回収し、サイト・ダイレクトド・ミュータジェネシス法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15. 63(1989)) により目的遺伝子を得ることは当業者にとり容易である。R S F D 8 0 を常法にしたがいAJ13125株に導入し、AJ13125/RSFD80を得た。AJ13125/RSFD80のL-リジン生産性について評価を行なった。コントロールとして、AJ13125/RSFPについてもL-リジン生産性の評価を行った。

培養は、実施例 3 と同様のL-リジン生産培地を用い、培養時間72時間、温度30℃の条件下、攪拌114~116rpmで行った。結果を表 6 に示す。

表 6

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量
AJ13125/RSFD80	9. 2 g / L
AJ13125/RSFP	0 g / L

#### 産業上の利用可能性

本発明により、L-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたエシエリヒア属細菌由来のDDPS変異遺伝子が得られた。この遺伝子を保持するセラチア属細菌は、L-リジンを著量生産する。また、前記DDPS変異遺伝子を、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼを保持するセラチア属細菌に導入することにより、さらにL-リジン生産量を増加させることができる。

配列表

## (1)一般情報

- (i) 出願人：味の素株式会社
- (ii) 発明の名称：発酵法によるL-リジンの製造法
- (iii) 配列数：14
- (iv) 連絡先：
  - (A)宛名：味の素株式会社
  - (B)番地：京橋1丁目15-1
  - (C)市：中央区
  - (D)州：東京都
  - (E)国：日本国
  - (F)ZIP：104
- (v) コンピュータ読取り可能形式
  - (A)媒体：フロッピーディスク
  - (B)コンピュータ：IBM PC 互換
  - (C)操作システム：PC-DOS/MS-DOS
  - (D)ソフトウェア：PatentIn
- (vi) 現行出願データ
  - (A)出願番号
  - (B)出願日
  - (C)分類
- (viii) 代理人／事務所情報
  - (A)名前：
  - (B)登録番号：
  - (C)整理番号：
- (ix) 通信情報
  - (A)電話番号：
  - (B)ファクシミリ番号：

## (2) 配列番号 1 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 20
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の説明 : 配列番号 1

CCGCAACTAC TGACATGACG 20

## (2) 配列番号 2 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 20
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の説明 : 配列番号 2

AGTAAGCCAT CAAATCTCCC 20

## (2) 配列番号 3 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 1197
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 二本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : genomic DNA

## (vi) 起源

- (A) 生物名 : エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)
- (B) 株名 : MC1061

## 配列の特徴：

特徴を表わす記号：prim transcript

存在位置：248

特徴を決定した方法：E

## 配列の特徴：

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：272..1150

特徴を決定した方法：E

## 配列の特徴：

特徴を表わす記号：primer bind

存在位置：27..46

特徴を決定した方法：E

## 配列の特徴：

特徴を表わす記号：primer bind

存在位置：1156..1175

特徴を決定した方法：E

## 配列の特徴：

特徴を表わす記号：RBS

存在位置：261..265

特徴を決定した方法：S

(xi) 配列の説明：配列番号 3

## 配列

CCAGGCGACT GTCTTCAATA TTACAGCCGC AACTACTGAC ATGACGGGTG ATGGTGTTC	60
CAATTCCACG GCGATCGGCA CCCAACGCAG TGATCACCAG ATAATGTGTT GCGATGACAG	120
TGTCAAACGTG GTTATTCCTT TAAGGGGTGA GTTGTCTTTA AGGAAAGCAT AAAAAAACA	180
TGCATACAAC AATCAGAACG GTTCTGTCTG CTTGCTTTTA ATGCCATACC AAACGTACCA	240

TTGAGACACT TGTTTGCACA GAGGATGGCC C ATG TTC ACG GGA AGT ATT GTC	292
Met Phe Thr Gly Ser Ile Val	
1 5	
GCG ATT GTT ACT CCG ATG GAT GAA AAA GGT AAT GTC TGT CGG GCT AGC	340
Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser	
10 15 20	
TTG AAA AAA CTG ATT GAT TAT CAT GTC GCC AGC GGT ACT TCG GCG ATC	388
Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile	
25 30 35	
GTT TCT GTT GGC ACC ACT GGC GAG TCC GCT ACC TTA AAT CAT GAC GAA	436
Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser Ala Thr Leu Asn His Asp Glu	
40 45 50 55	
CAT GCT GAT GTG GTG ATG ATG ACG CTG GAT CTG GCT GAT GGG CGC ATT	484
His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile	
60 65 70	
CCG GTA ATT GCC GGG ACC GGC GCT AAC GCT ACT GCG GAA GCC ATT AGC	532
Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser	
75 80 85	
CTG ACG CAG CGC TTC AAT GAC AGT GGT ATC GTC GGC TGC CTG ACG GTA	580
Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly Ile Val Gly Cys Leu Thr Val	
90 95 100	
ACC CCT TAC TAC AAT CGT CCG TCG CAA GAA GGT TTG TAT CAG CAT TTC	628
Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe	
105 110 115	
AAA GCC ATC GCT GAG CAT ACT GAC CTG CCG CAA ATT CTG TAT AAT GTG	676
Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val	
120 125 130 135	
CCG TCC CGT ACT GGC TGC GAT CTG CTC CCG GAA ACG GTG GGC CGT CTG	724
Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu	
140 145 150	

GCG AAA GTA AAA AAT ATT ATC GGA ATC AAA GAG GCA ACA GGG AAC TTA	772
Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu	
155 160 165	
ACG CGT GTA AAC CAG ATC AAA GAG CTG GTT TCA GAT GAT TTT GTT CTG	820
Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu Val Ser Asp Asp Phe Val Leu	
170 175 180	
CTG AGC GGC GAT GAT GCG AGC GCG CTG GAC TTC ATG CAA TTG GGC GGT	868
Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly	
185 190 195	
CAT GGG GTT ATT TCC GTT ACG ACT AAC GTC GCA GCG CGT GAT ATG GCC	916
His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn Val Ala Ala Arg Asp Met Ala	
200 205 210 215	
CAG ATG TGC AAA CTG GCA GCA GAA GAA CAT TTT GCC GAG GCA CGC GTT	964
Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu His Phe Ala Glu Ala Arg Val	
220 225 230	
ATT AAT CAG CGT CTG ATG CCA TTA CAC AAC AAA CTA TTT GTC GAA CCC	1012
Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro	
235 240 245	
AAT CCA ATC CCG GTG AAA TGG GCA TFT AAG GAA CTG GGT CTT GTG GCG	1060
Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala	
250 255 260	
ACC GAT ACG CTG CGC CTG CCA ATG ACA CCA ATC ACC GAC AGT GGT CGT	1108
Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg	
265 270 275	
GAG ACG GTC AGA GCG GCG CTT AAG CAT GCC GGT TTG CTG T AAAGTTTAGG	1158
Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His Ala Gly Leu Leu	
280 285 290	
GAGATTTGAT GGCTTACTCT GTTCAAAAGT CGCGCCTGG	1197

## (2) 配列番号 4 に関する情報

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ : 292

(B) 種類 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 分子タイプ : ペプチド

## (xi) 配列の説明 : 配列番号 4

Met	Phe	Thr	Gly	Ser	Ile	Val	Ala	Ile	Val	Thr	Pro	Met	Asp	Glu	Lys
1				5					10					15	
Gly	Asn	Val	Cys	Arg	Ala	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Ile	Asp	Tyr	His	Val
		20						25					30		
Ala	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ile	Val	Ser	Val	Gly	Thr	Thr	Gly	Glu	Ser
		35					40					45			
Ala	Thr	Leu	Asn	His	Asp	Glu	His	Ala	Asp	Val	Val	Met	Met	Thr	Leu
	50					55					60				
Asp	Leu	Ala	Asp	Gly	Arg	Ile	Pro	Val	Ile	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Asn
	65				70					75				80	
Ala	Thr	Ala	Glu	Ala	Ile	Ser	Leu	Thr	Gln	Arg	Phe	Asn	Asp	Ser	Gly
			85						90					95	
Ile	Val	Gly	Cys	Leu	Thr	Val	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ser	Gln
		100						105					110		
Glu	Gly	Leu	Tyr	Gln	His	Phe	Lys	Ala	Ile	Ala	Glu	His	Thr	Asp	Leu
		115						120					125		
Pro	Gln	Ile	Leu	Tyr	Asn	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Gly	Cys	Asp	Leu	Leu
		130					135					140			
Pro	Glu	Thr	Val	Gly	Arg	Leu	Ala	Lys	Val	Lys	Asn	Ile	Ile	Gly	Ile
	145					150				155				160	
Lys	Glu	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Thr	Arg	Val	Asn	Gln	Ile	Lys	Glu	Leu
					165					170				175	



Val Ser Asp Asp Phe Val Leu Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu  
                   180                  185                  190  
 Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn  
                   195                  200                  205  
 Val Ala Ala Arg Asp Met Ala Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu  
                   210                  215                  220  
 His Phe Ala Glu Ala Arg Val Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His  
                   225                  230                  235                  240  
 Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys  
                   245                  250                  255  
 Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr  
                   260                  265                  270  
 Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His  
                   275                  280                  285  
 Ala Gly Leu Leu  
                   290

## (2) 配列番号 5 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 20
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の説明 : 配列番号 5

CTTCCCTTGT GCCAAGGCTG 20

## (2) 配列番号 6 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 18

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii)分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi)配列の説明：配列番号 6

GAATTCCTTT GCGAGCAG 18

(2) 配列番号 7 に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：2147

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii)分子タイプ：genomic DNA

(vi)起源

(A) 生物名：エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)

(B) 株名：MC1061

配列の特徴：

特徴を表わす記号：-35 signal

存在位置：242..249

特徴を決定した方法：S

配列の特徴：

特徴を表わす記号：-10 signal

存在位置：265..273

特徴を決定した方法：S

配列の特徴：

特徴を表わす記号：primer bind

存在位置 : 536..555

特徴を決定した方法 : E

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : primer bind

存在位置 : 2128..2147

特徴を決定した方法 : E

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : RBS

存在位置 : 575..578

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : CDS

存在位置 : 584..1933

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : terminator

存在位置 : 1941..1968

特徴を決定した方法 : S

(xi) 配列の説明 : 配列番号 7

TCGAAGTGTT TCTGTAGTGC CTGCCAGGCA GCGGTCTGCG TTGGATTGAT GTTTTTCATT	60
AGCAATACTC TTCTGATTTT GAGAATTGTG ACTTTGGAAG ATTGTAGCGC CAGTCACAGA	120
AAAAATGTGAT GGTTTTAGTG CCGTTAGCGT AATGTTGAGT GTAAACCCTT AGCGCAGTGA	180
AGCATTTATT AGCTGAACTA CTGACCGCCA GGAGTGGATG AAAAATCCGC ATGACCCCAT	240
CGTTGACAAC CGCCCCGCTC ACCCTTTATT TATAAATGTA CTACCTGCGC TAGCGCAGGC	300
CAGAAGAGGC GCGTTGCCCA AGTAACGGTG TTGGAGGAGC CAGTCCTGTG ATAACACCTG	360

AGGGGGTGCA TCGCCGAGGT GATTGAACGG CTGGCCACGT TCATCATCGG CTAAGGGGGC 420  
 TGAATCCCCT GGGTTGTAC CAGAAGCGTT CGCAGTCGGG CGTTTCGCAA GTGGTGGAGC 480  
 ACTTCTGGGT GAAAATAGTA GCGAAGTATC GCTCTGCGCC CACCCGTCTT CCGCTCTTCC 540  
 CTTGTGCCAA GGCTGAAAAT GGATCCCCTG ACACGAGGTA GTT ATG TCT GAA ATT 595  
 Met Ser Glu Ile  
 1  
 GTT GTC TCC AAA TTT GGC GGT ACC AGC GTA GCT GAT TTT GAC GCC ATG 643  
 Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp Phe Asp Ala Met  
 5 10 15 20  
 AAC CGC AGC GCT GAT ATT GTG CTT TCT GAT GCC AAC GTG CGT TTA GTT 691  
 Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn Val Arg Leu Val  
 25 30 35  
 GTC CTC TCG GCT TCT GCT GGT ATC ACT AAT CTG CTG GTC GCT TTA GCT 739  
 Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu Val Ala Leu Ala  
 40 45 50  
 GAA GGA CTG GAA CCT GGC GAG CGA TTC GAA AAA CTC GAC GCT ATC CGC 787  
 Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu Asp Ala Ile Arg  
 55 60 65  
 AAC ATC CAG TTT GCC ATT CTG GAA CGT CTG CGT TAC CCG AAC GTT ATC 835  
 Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr Pro Asn Val Ile  
 70 75 80  
 CGT GAA GAG ATT GAA CGT CTG CTG GAG AAC ATT ACT GTT CTG GCA GAA 883  
 Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr Val Leu Ala Glu  
 85 90 95 100  
 GCG GCG GCG CTG GCA ACG TCT CCG GCG CTG ACA GAT GAG CTG GTC AGC 931  
 Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp Glu Leu Val Ser  
 105 110 115  
 CAC GGC GAG CTG ATG TCG ACC CTG CTG TTT GTT GAG ATC CTG CGC GAA 979  
 His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu Ile Leu Arg Glu  
 120 125 130

CGC GAT GTT CAG GCA CAG TGG TTT GAT GTA CGT AAA GTG ATG CGT ACC	1027
Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys Val Met Arg Thr	
135 140 145	
AAC GAC CGA TTT GGT CGT GCA GAG CCA GAT ATA GCC GCG CTG GCG GAA	1075
Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala Ala Leu Ala Glu	
150 155 160	
CTG GCC GCG CTG CAG CTG CTC CCA CGT CTC AAT GAA GGC TTA GTG ATC	1123
Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu Gly Leu Val Ile	
165 170 175 180	
ACC CAG GGA TTT ATC GGT AGC GAA AAT AAA GGT CGT ACA ACG ACG CTT	1171
Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg Thr Thr Thr Leu	
185 190 195	
GGC CGT GGA GGC AGC GAT TAT ACG GCA GCC TTG CTG GCG GAG GCT TTA	1219
Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Leu	
200 205 210	
CAC GCA TCT CGT GTT GAT ATC TGG ACC GAC GTC CCG GGC ATC TAC ACC	1267
His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro Gly Ile Tyr Thr	
215 220 225	
ACC GAT CCA CGC GTA GTT TCC GCA GCA AAA CGC ATT GAT GAA ATC GCG	1315
Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile Asp Glu Ile Ala	
230 235 240	
TTT GCC GAA GCG GCA GAG ATG GCA ACT TTT GGT GCA AAA GTA CTG CAT	1363
Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala Lys Val Leu His	
245 250 255 260	
CCG GCA ACG TTG CTA CCC GCA GTA CGC AGC GAT ATC CCG GTC TTT GTC	1411
Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile Pro Val Phe Val	
265 270 275	
GGC TCC AGC AAA GAC CCA CGC GCA GGT GGT ACG CTG GTG TGC AAT AAA	1459
Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Cys Asn Lys	
280 285 290	

ACT GAA AAT CCG CCG CTG TTC CGC GCT CTG GCG CTT CGT CGC AAT CAG	1507
Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu Arg Arg Asn Gln	
295 300 305	
ACT CTG CTC ACT TTG CAC AGC CTG AAT ATG CTG CAT TCT CGC GGT TTC	1555
Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His Ser Arg Gly Phe	
310 315 320	
CTC GCG GAA GTT TTC GGC ATC CTC GCG CGG CAT AAT ATT TCG GTA GAC	1603
Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn Ile Ser Val Asp	
325 330 335 340	
TTA ATC ACC ACG TCA GAA GTG AGC GTG GCA TTA ACC CTT GAT ACC ACC	1651
Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr Leu Asp Thr Thr	
345 350 355	
GGT TCA ACC TCC ACT GGC GAT ACG TTG CTG ACG CAA TCT CTG CTG ATG	1699
Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln Ser Leu Leu Met	
360 365 370	
GAG CTT TCC GCA CTG TGT CGG GTG GAG GTG GAA GAA GGT CTG GCG CTG	1747
Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu Gly Leu Ala Leu	
375 380 385	
GTC GCG TTG ATT GGC AAT GAC CTG TCA AAA GCC TGC GGC GTT GGC AAA	1795
Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys Gly Val Gly Lys	
390 395 400	
GAG GTA TTC GGC GTA CTG GAA CCG TTC AAC ATT CGC ATG ATT TGT TAT	1843
Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg Met Ile Cys Tyr	
405 410 415 420	
GGC GCA TCC AGC CAT AAC CTG TGC TTC CTG GTG CCC GGC GAA GAT GCC	1891
Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro Gly Glu Asp Ala	
425 430 435	
GAG CAG GTG GTG CAA AAA CTG CAT AGT AAT TTG TTT GAG TAAATACTGT	1940
Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe Glu	
440 445	

ATGGCCTGGA AGCTATATTT CGGGCCGTAT TGATTTTCTT GTCACATATGC TCATCAATAA 2000  
 ACGAGCCTGT ACTCTGTAA CCAGCGTCTT TATCGGAGAA TAATTGCCTT TAATTTTTTT 2060  
 ATCTGCATCT CTAATTAATT ATCGAAAGAG ATAAATAGTT AAGAGAAGGC AAAATGAATA 2120  
 TTATCAGTTC TGCTCGCAAA GGAATTC 2147

## (2) 配列番号 8 に関する情報

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ : 449

(B) 種類 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 分子タイプ : ペプチド

## (xi) 配列の説明 : 配列番号 8

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn  
 20 25 30  
 Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu  
 35 40 45  
 Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu  
 50 55 60  
 Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr  
 65 70 75 80  
 Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr  
 85 90 95  
 Val Leu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp  
 100 105 110  
 Glu Leu Val Ser His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu  
 115 120 125  
 Ile Leu Arg Glu Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys  
 130 135 140

Val Met Arg Thr Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala  
 145                      150                      155                      160  
 Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu  
                          165                      170                      175  
 Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg  
                          180                      185                      190  
 Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu  
                          195                      200                      205  
 Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro  
                          210                      215                      220  
 Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile  
 225                      230                      235                      240  
 Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala  
                          245                      250                      255  
 Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile  
                          260                      265                      270  
 Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu  
                          275                      280                      285  
 Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu  
                          290                      295                      300  
 Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His  
 305                      310                      315                      320  
 Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn  
                          325                      330                      335  
 Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr  
                          340                      345                      350  
 Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln  
                          355                      360                      365  
 Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu  
                          370                      375                      380



Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys  
 385                      390                      395                      400  
 Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg  
                     405                      410                      415  
 Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro  
                     420                      425                      430  
 Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe  
                     435                      440                      445  
 Glu

## (2) 配列番号 9 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 20
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の説明 : 配列番号 9

CATCTAAGTA TGCATCTCGG 20

## (2) 配列番号 10 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 20
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の説明 : 配列番号 10

TGCCCCCTCGA GCTAAATTAG 20

## (2) 配列番号11に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ：20
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明：配列番号11

TTTATTCATA ATTGCCACCG 20

## (2) 配列番号12に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ：20
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明：配列番号12

CACGGTAATA CATATAACCG 20

## (2) 配列番号13に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ：20
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明：配列番号13

CCTGCAATTG TCAAACGTCC 20

(2) 配列番号14に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 20

(B) 種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明 : 配列番号14

GTCGACGCGC TTGAGATCTT 20

## 請求の範囲

1. L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAが細胞内に導入されて形質転換されたセラチア属細菌。

2. 前記ジヒドロジピコリン酸合成酵素がエシェリヒア属細菌由来である請求項1記載のDNA。

3. L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異が、配列表の配列番号4に記載されるジヒドロジピコリン酸合成酵素のアミノ酸配列中、N-末端から81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させる変異、118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異、81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させかつ118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項2記載のセラチア属細菌。

4. さらに、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼを保持することを特徴とする請求項1記載のセラチア属細菌。

5. L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するアスパルトキナーゼをコードするDNAが細胞内に導入されたことにより、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼを保持することを特徴とする請求項4記載のセラチア属細菌。

6. 前記アスパルトキナーゼが、エシェリヒア属細菌由来のアスパルトキナーゼIIIである請求項5記載のセラチア属細菌。

7. アスパルトキナーゼIIIのL-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異が、配列表の配列番号8に記載されるアスパルトキナーゼIIIのアミノ酸配列中、N-末端から323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させかつ408番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、34番目のアルギニン残基をシステイン残基に置換させかつ323番目のグリシン残基をアスパ

ラギン酸残基に置換させる変異、325番目のロイシン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、318番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、318番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ349番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、345番目のセリン残基をロイシン残基に置換させる変異、347番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、352番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、352番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ369番目のセリン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、164番目のグルタミン酸残基をリジン残基に置換させる変異、417番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ419番目のシステイン残基をチロシン残基に置換させる変異、よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項6記載のセラチア属細菌。

8. リジンデカルボキシラーゼを欠損した請求項1記載のセラチア属細菌。

9. 請求項1～8のいずれか一項に記載のセラチア属細菌を好適な培地で培養し、該培養物中にL-リジンを生産蓄積せしめ、該培養物からL-リジンを採取することを特徴とするL-リジンの製造法。

1 / 9

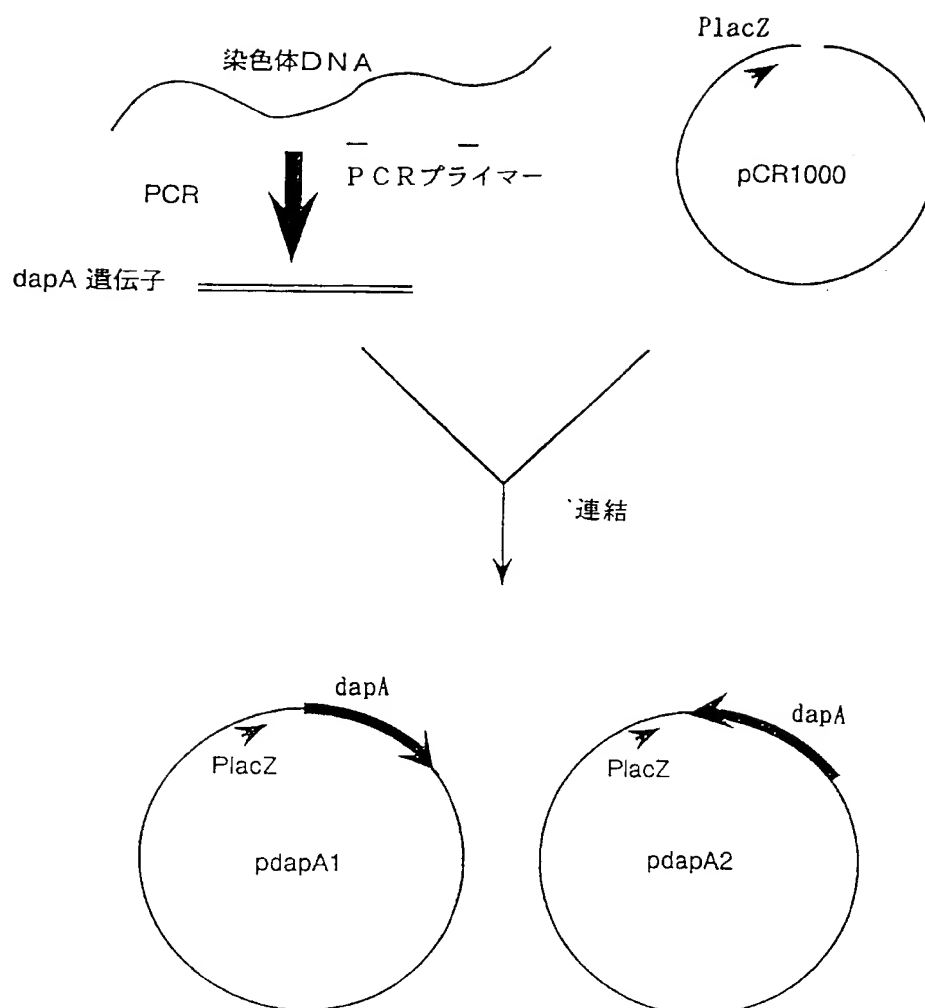


FIG. 1

2 / 9

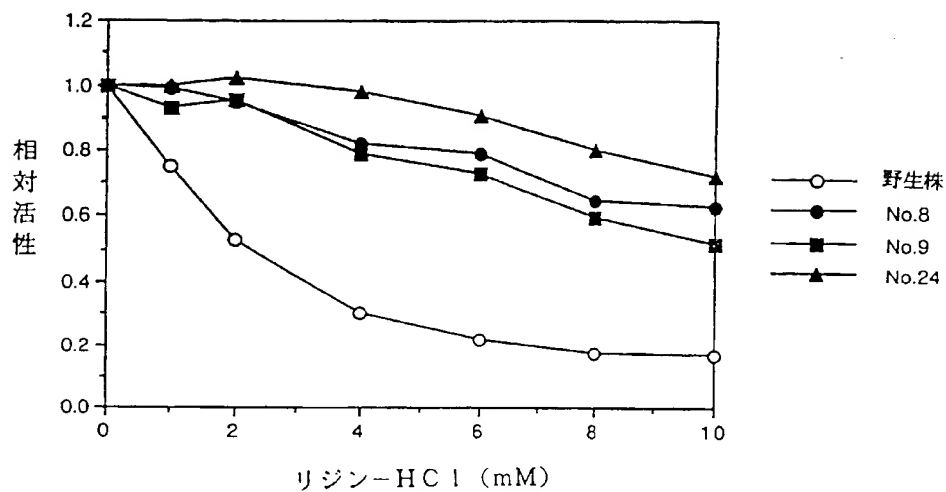


FIG. 2

3 / 9

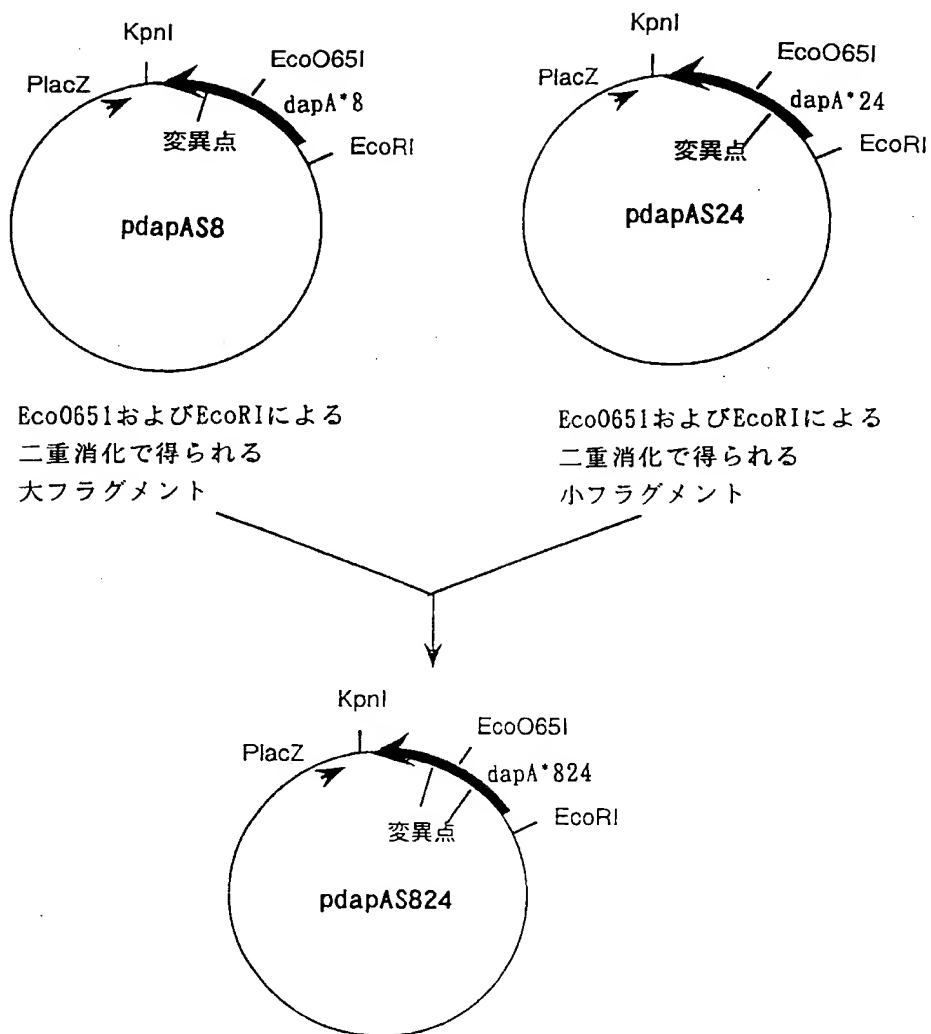
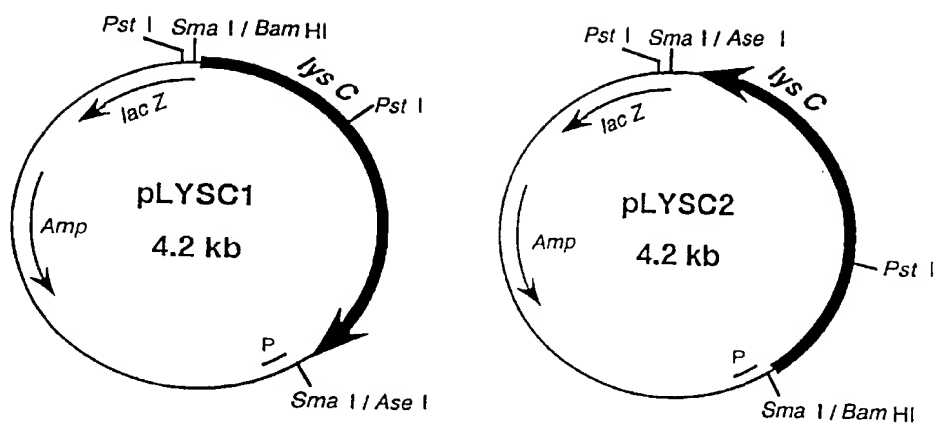


FIG. 3



4 / 9



F I G. 4

5 / 9

ヒドロキシルアミンによる変異導入

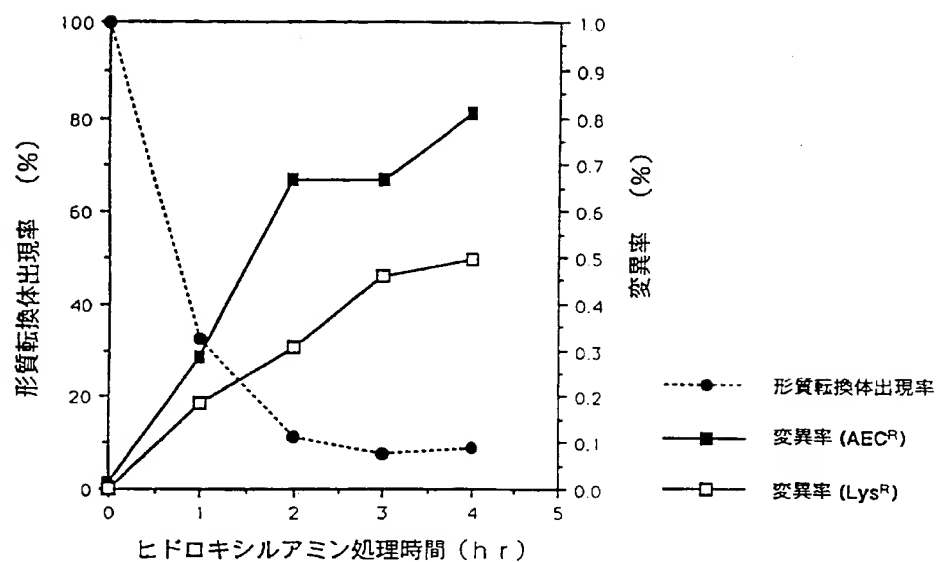


FIG. 5

6 / 9

FIG. 6A

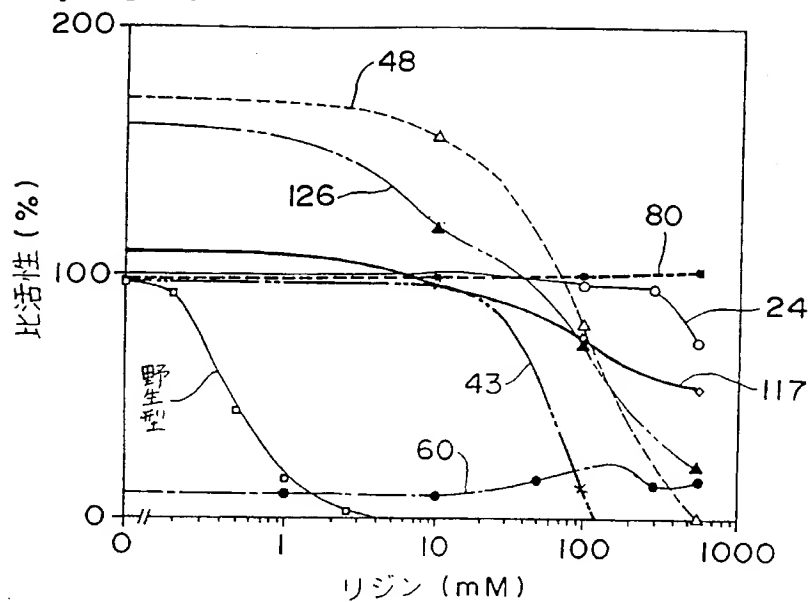
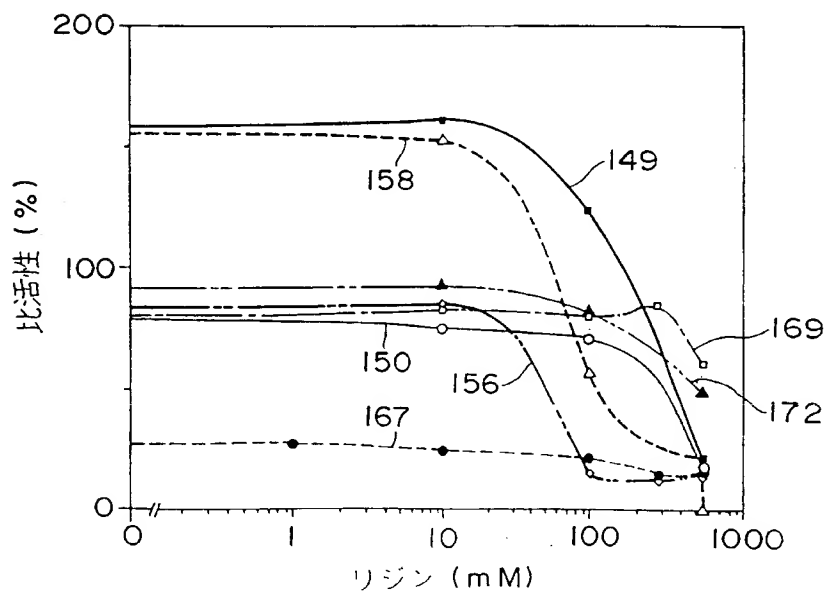


FIG. 6B



7 / 9

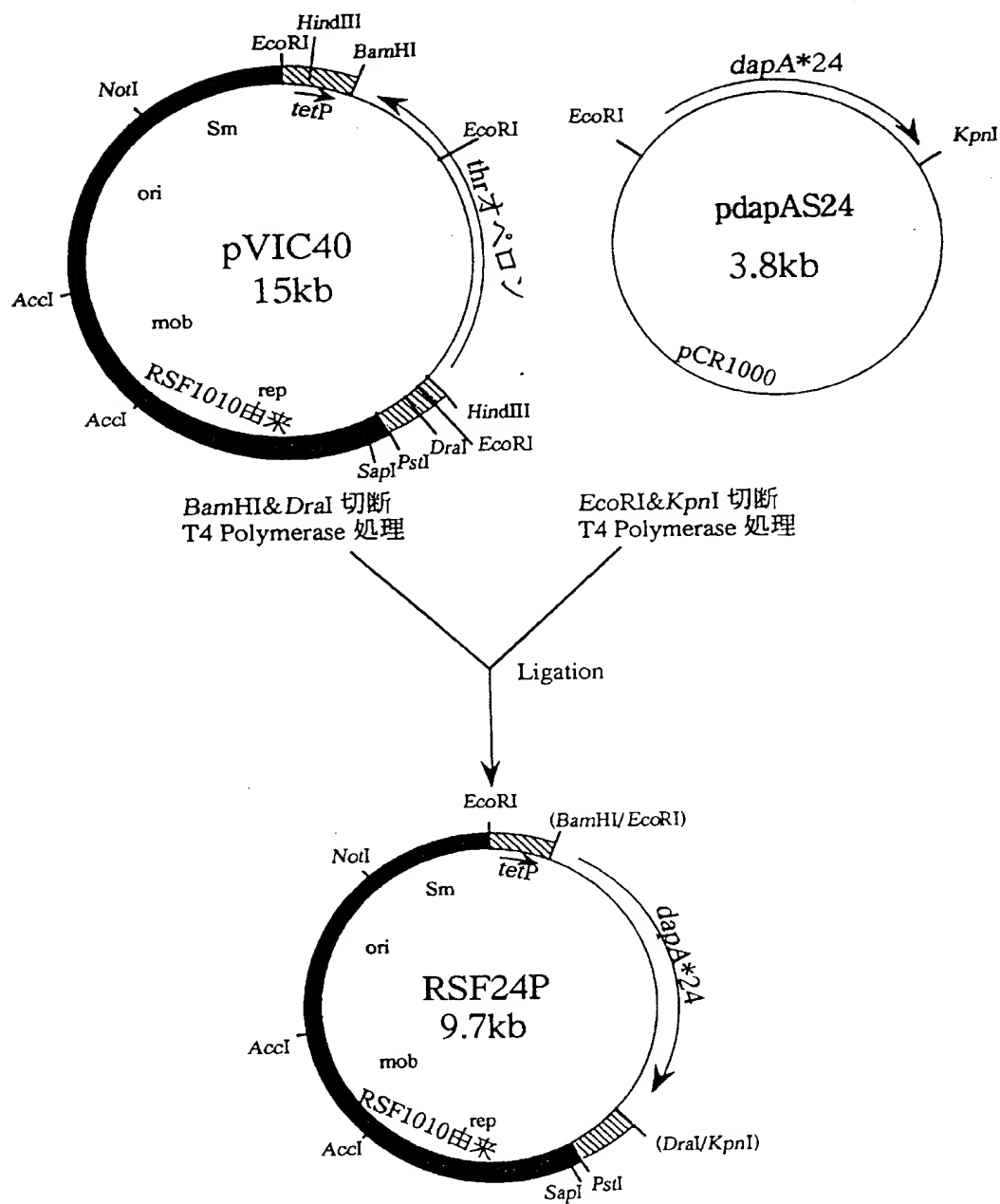


FIG. 7

8 / 9

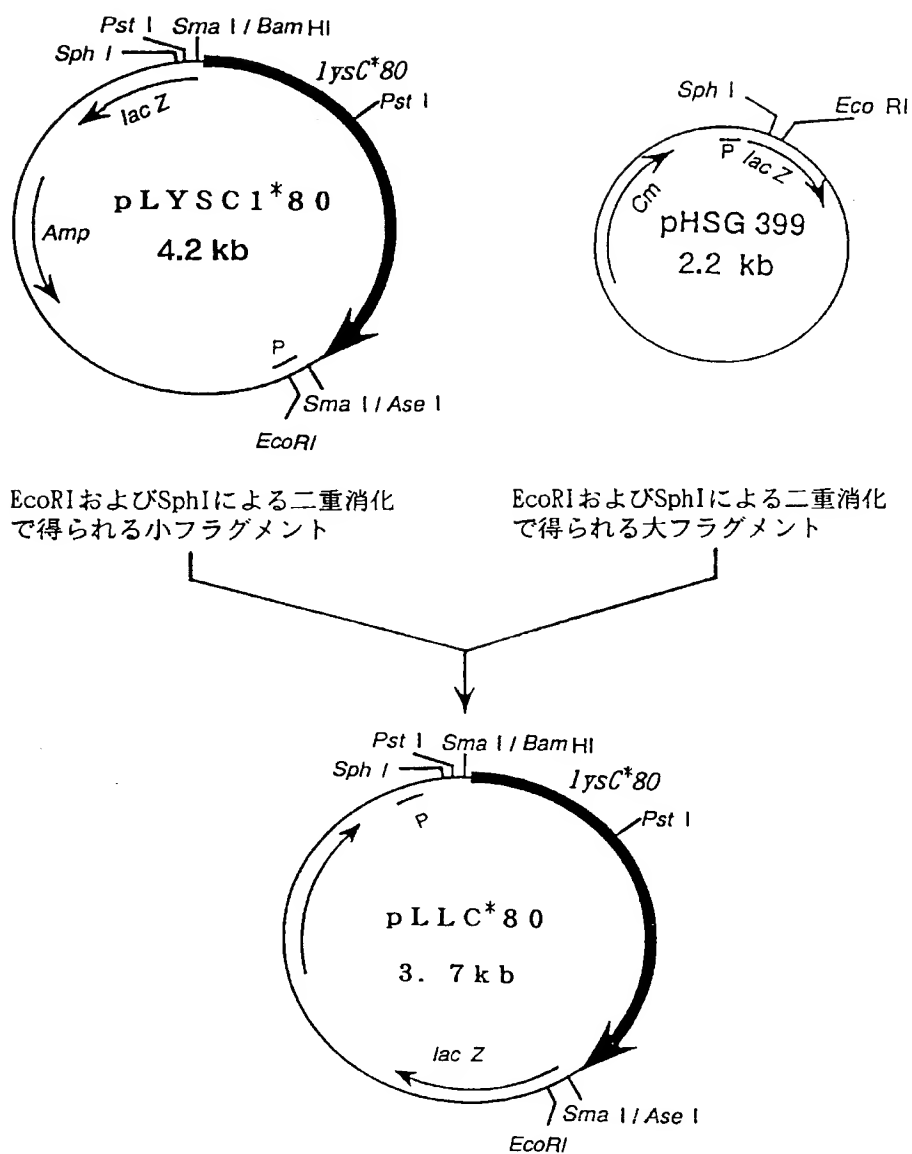


FIG. 8

9 / 9

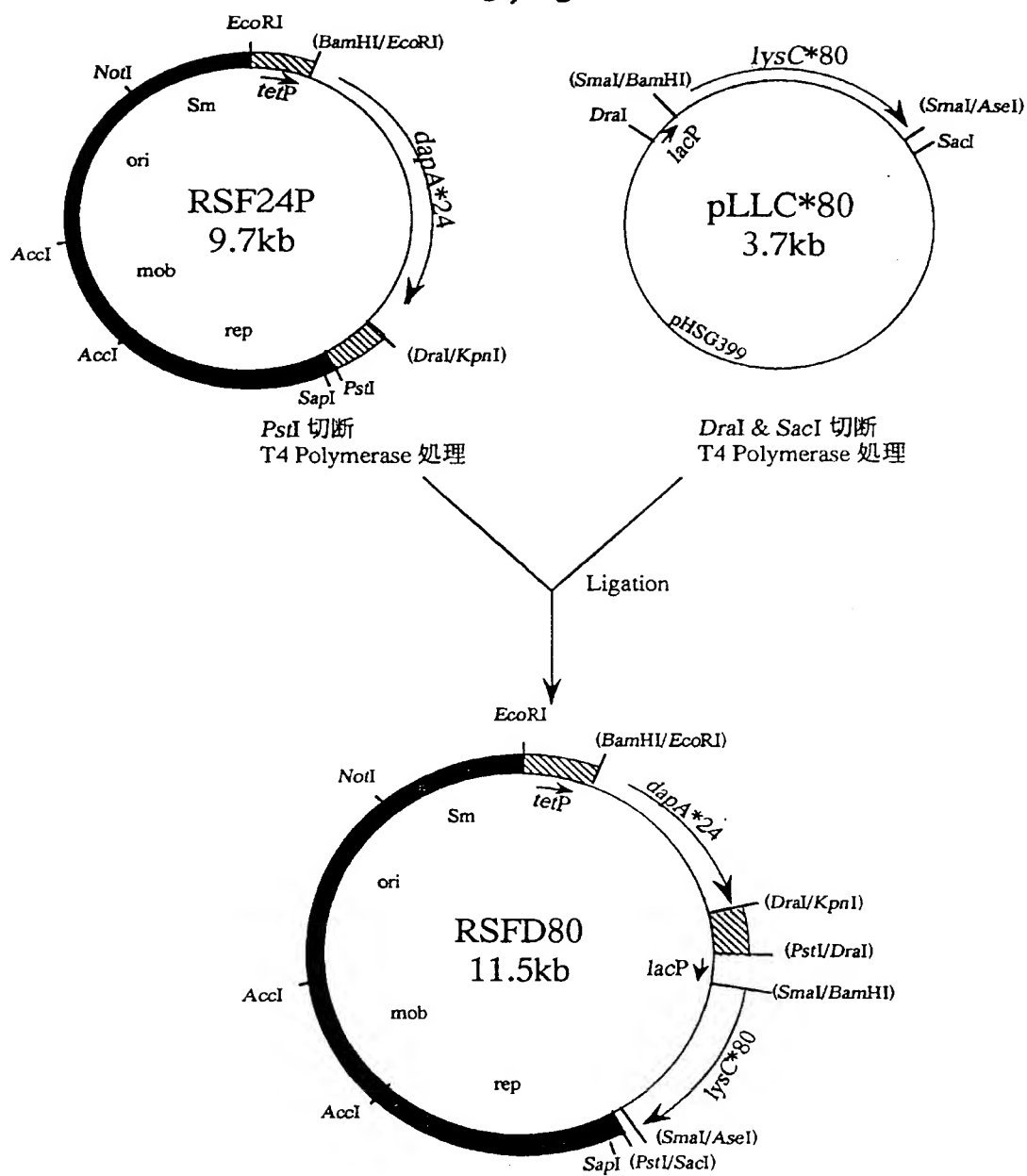


FIG. 9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00648

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/00, C12N9/88, C12N9/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/00, C12N9/88, C12N9/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEW, CAS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	JP, 7-155148, A1 (Ajinomoto Co., Inc.), June 20, 1995 (20. 06. 95), Claim & WO, 9516042, A & AU, 9524688, A	1 - 9
Y	WO, 9411517, A1 (Ajinomoto Co., Inc.), May 26, 1994 (26. 05. 94), Claim & EP, 643135, A1 & SK, 9400819, A3 & CZ, 9401658, A3	1 - 9
Y	JP, 7504821, W (E.I. Du Pont de Nemours and Co.), June 1, 1995 (01. 06. 95), Claim & WO, 9319190, A1 & EP, 640141, A1 & AU, 9339233, A & ZA, 9301978, A	1 - 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 11, 1996 (11. 06. 96)

Date of mailing of the international search report

June 18, 1996 (18. 06. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/00, C12N9/88, C12N9/12		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/00, C12N9/88, C12N9/12		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSYS PREVIEW, CAS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	J P, 7-155148, A1 (味の素株式会社) 20. 6月1995 (20. 06. 95) 特許請求の範囲 & WO, 9516042, A & AU, 9524688, A	1-9
Y	WO, 9411517, A1 (味の素株式会社) 26. 5月. 1994 (26. 05. 94) 特許請求の範囲 & EP, 643135, A1 & SK, 9400819, A3 & CZ, 9401658, A3	1-9
Y	J P, 7504821, W (イー・アイ・デュボン・ドウ・ヌムール・アンド・カ ンパニー) 01. 6月. 1995 (01. 06. 95) 特許請求の範囲 & WO, 9319190, A1 & EP, 640141, A1 & AU, 9339233, A & ZA, 9301978, A	1-9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
11. 06. 96	18.06.96	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永みどり 印	4 B 9152
	電話番号 03-3581-1101 内線	3449